

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

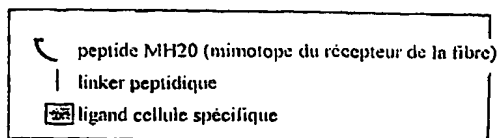
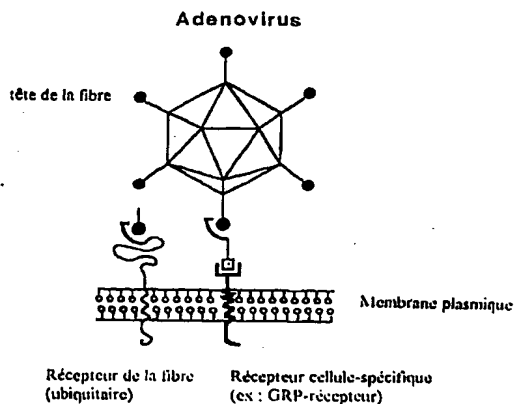
(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/86, C07K 14/74, C12N 5/10, C07K 14/075, 14/78, A61K 48/00, C07K 14/705, C12N 15/62	A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/33929 (43) Date de publication internationale: 6 août 1998 (06.08.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/00184 (22) Date de dépôt international: 30 janvier 1998 (30.01.98) (30) Données relatives à la priorité: 97/01005 30 janvier 1997 (30.01.97) FR 97/11166 9 septembre 1997 (09.09.97) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BOULANGER, Pierre [FR/FR]; 6, rue Maguelone, F-34000 Montpellier (FR). HONG, Saw, See [MY/FR]; 6, rue Maguelone, F-34000 Montpellier (FR). KARAYAN, Lucie [FR/FR]; 11, rue des Arènes Romaines, F-86000 Poitiers (FR). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).	(81) Etats désignés: AU, CA, JP, SG, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>	

(54) Title: USE OF A POLYPEPTIDE AS CELL RECEPTOR FOR ADENOVIRUSES**(54) Titre:** UTILISATION D'UN POLYPEPTIDE A TITRE DE RECEPTEUR CELLULAIRE DES ADENOVIRUS**(57) Abstract**

The invention concerns the use of a polypeptide comprising at least 6 continuous amino acids of the sequence as shown in the sequence identifiers 1 to 5 as cell receptor and/or co-receptor of adenoviruses. It also concerns the use of a cell capable of expressing such a polypeptide and that of a ligand capable of influencing the binding of an adenovirus to a host cell and/or its insertion in said cell. Finally, the invention further concerns a method for selecting or identifying a cell receptor of a virus or part of a viral protein determining the binding of the virus to its cell receptor and the use of a bi-functional ligand for targeting an adenovirus towards a host cell bearing on its surface a surface protein other than the natural cell receptor of said adenovirus.

(57) Abrégé

La présente invention a pour objet l'utilisation d'un polypeptide comprenant au moins 6 acides aminés continus de la séquence telle que montrée dans les identificateurs de séquence 1 à 5 à titre de récepteur et/ou co-récepteur cellulaire des adénovirus. Elle concerne également l'utilisation d'une cellule capable d'exprimer un tel polypeptide ainsi que celle d'un ligand capable d'influencer l'attachement d'un adénovirus à une cellule hôte et/ou son entrée au sein de ladite cellule hôte. Enfin, elle a également trait à une méthode pour sélectionner ou identifier un récepteur cellulaire d'un virus ou la partie d'une protéine virale déterminant l'attachement du virus à son récepteur cellulaire ainsi qu'à l'utilisation d'un ligand bifonctionnel pour cibler un adénovirus vers une cellule hôte portant à sa surface une protéine de surface autre que le récepteur cellulaire naturel dudit adénovirus.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

UTILISATION D'UN POLYPEPTIDE A TITRE DE RECEPTEUR CELLULAIRE DES ADENOVIRUS

La présente invention a pour objet l'utilisation de tout ou partie d'un antigène
5 du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et/ou d'un module de type III de
la fibronectine pour permettre ou faciliter l'attachement d'un adénovirus sur une
cellule hôte et/ou son entrée au sein de celle-ci. L'invention vise également
l'utilisation d'un ligand capable de moduler l'infectivité d'un adénovirus vis à vis d'une
cellule hôte, médiée par l'un ou l'autre des polypeptides cités ci-dessus. Enfin,
10 l'invention concerne une méthode de biorpaillage pour identifier ou sélectionner un
récepteur cellulaire d'un adénovirus ou un de ces ligands, notamment d'origine virale.

Les adénovirus sont des virus à ADN d'un large spectre d'hôte. Ils ont été
mis en évidence dans de nombreuses espèces animales et peuvent infecter divers
types cellulaires. De nombreux sérotypes ont été caractérisés au sein de chaque
15 espèce qui présentent une organisation génomique et un cycle infectieux
comparables. D'une manière générale, le génome adénoviral est constitué d'une
molécule d'ADN linéaire, bicaténaire et d'environ 36kb contenant les gènes codant
pour les protéines virales et à ses extrémités deux répétitions inversées (désignées
ITR) intervenant dans la réplication et la région d'encapsidation.

20 Les adénovirus se répliquent dans les noyaux des cellules infectées. Le cycle
infectieux se déroule en 2 étapes. La phase précoce précède l'initiation de la
réplication et permet de produire les protéines précoces régulant la réplication et la
transcription de l'ADN viral. Ces étapes sont suivies de la phase tardive au cours de
laquelle sont synthétisées les protéines structurales qui constituent les particules
25 virales. L'assemblage des nouveaux virions prend place dans le noyau. Dans un
premier temps, les protéines virales s'assemblent de manière à former des capsides
vides de structure icosaédrique, dans lesquelles l'ADN adénoviral est encapsidé. Les
particules virales sont libérées et susceptibles d'infecter d'autres cellules permissives.
A cet égard, la fibre et le penton base présents à la surface des capsides jouent un

- 2 -

rôle critique dans l'attachement cellulaire des virions et leur internalisation.

- L'adénovirus se lie à la surface des cellules permissives par l'intermédiaire de la fibre trimérique et d'un récepteur cellulaire jusqu'à présent, non identifié. Puis, la particule est internalisée par endocytose par liaison du penton base aux intégrines cellulaires $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ (Belin et Boulanger, 1993, *J. Gen. Virol.* 74, 1485-1497 ; Mathias et al., 1994, *J. Virol.* 68, 6811-6814 ; Nemerow et al., 1994, *Trends Cell Biol.* 4, 52-55 ; Wickham et al., 1993, *Cell* 73, 309-319 ; Wickham et al., 1994, *J. Cell Biol.* 127, 257-264). La fibre d'Ad2 comporte 580 acides aminés (aa) dont la séquence est divulguée dans Herissé et al. (1981, *Nucleic Acid Res.* 9, 4023-4042). Celle d'Ad 5 présente 582 acides aminés (Chroboczek et Jacrot, 1987, *Virology* 161, 549-554). Sa masse moléculaire est de 62 kDa, mais la fibre native se comporte comme une molécule de 160-180 kDa confirmant son assemblage sous forme d'un trimère.

- La fibre est composée de 3 domaines (Chroboczek et al., 1995, *Current Top. Microbiol. Immunol.* 199, 165-200) :

- (1) En N-terminal, la "queue" très conservée d'un sérotype à l'autre, interagit avec le penton base et assure l'ancrage de la molécule dans la capside.
- (2) La "tige" est une structure en bâtonnet de longueur variable selon les sérotypes. Par exemple, la tige de la fibre d'Ad5 contient 22 répétitions d'un motif de 15 résidus qui pourraient adopter une conformation en feuillet β . Le nombre de ces répétitions diffère d'un sérotype à l'autre, ce qui explique les variations de longueur.
- (3) Enfin, à l'extrémité distale de la tige, la "tête" ou sphéricule terminale est une structure globulaire contenant les signaux de trimérisation (Hong et Engler, 1996, *J. Virol.* 70, 7071-7078 ; Novelli et Boulanger, 1991, *J. Biol. Chem.* 266, 9299-9303 ; Novelli et Boulanger, 1991, *Virology* 185, 365-376). La plupart des données expérimentales montrent que c'est le domaine de la tête qui est responsable de la liaison aux cellules permissives (Krasnykh et al., 1996, *J. Virol.* 70, 6839-6846).
- (4) La complexité de l'attachement adénoviral laisse supposer qu'il serait sérotype

- 3 -

dépendant et que plusieurs protéines cellulaires pourraient y participer. En ce qui concerne l'Ad2, Hong et Boulanger (1995, EMBO J. 14, 4714-4727) ont identifié un certain nombre de motifs peptidiques trouvés dans plusieurs protéines cellulaires de surface susceptibles d'interagir avec les protéines capsidaires (penton base et fibre), en particulier les modules de type III 5 et 14 de la fibronectine humaine. Les auteurs ont opéré par immobilisation sur un support inerte du penton base ou de la fibre (ligand) sur laquelle ils ont fait réagir une bibliothèque de phages exprimant des hexapeptides aléatoires (désignés phagotopes). Les phages adsorbés, qui en théorie expriment des phagotopes interagissant avec un motif porté par la protéine adénovirale, sont ensuite élués soit classiquement à pH acide ou par compétition avec l'autre partenaire capsidaire non immobilisé (éluant). Cependant, le récepteur cellulaire des adénovirus et la région de la tête précisément impliquée dans la liaison au récepteur n'ont à ce jour pas encore été clairement identifiés.

On a maintenant procédé à une nouvelle technique de "biorpaillage" (pour biopanning en anglais) dans laquelle le ligand immobilisé est constitué par le domaine de la tête de la fibre d'Ad5 et l'éluant par un anticorps neutralisant dirigé contre cette dernière et isolé deux classes de phagotopes selon l'anticorps mis en oeuvre. La première correspond à une séquence conservée au sein du domaine α -2 des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (α -2 MHC-I) et la seconde à une séquence retrouvée dans les modules III de la fibronectine humaine (FNIII). Les données reportées dans les exemples qui suivent, soutiennent l'hypothèse que le α -2 MHC-I constitue le récepteur primaire des adénovirus de sérotypes C et confirment la participation des FNIII à titre de co-récepteur ou co-facteur. On a également mis en évidence les régions de ces deux récepteurs et de la fibre interagissant l'une avec l'autre. En outre, on a généré un peptide antagoniste reproduisant le motif du domaine α -2 MHC-I qui neutralise l'attachement des adénovirus et un peptide agoniste reproduisant les motifs FNIII qui stimule l'attachement.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet l'utilisation d'un polypeptide

- 4 -

comprenant une séquence en acides aminés homologue ou identique à au moins 6 acides aminés continus de la séquence telle que montrée :

- (a) dans la SEQ ID NO: 1 commençant avec le résidu leucine en position 1 et finissant avec le résidu glutamine en position 25,
 - 5 (b) dans la SEQ ID NO: 2 commençant avec le résidu asparagine en position 1 et finissant avec le résidu asparagine en position 26,
 - (c) dans la SEQ ID NO: 3 commençant avec le résidu valine en position 1 et finissant avec le résidu asparagine en position 25,
 - (d) dans la SEQ ID NO: 4 commençant avec le résidu sérine en position 1 et
10 finissant avec le résidu arginine en position 25, et/ou
 - (e) dans la SEQ ID NO: 5 commençant avec le résidu asparagine en position 1 et finissant avec le résidu sérine en position 25 ;
- pour permettre ou faciliter l'attachement d'un adénovirus à une cellule hôte et/ou l'entrée dudit adénovirus au sein de ladite cellule hôte.

- 15 Aux termes de la présente invention, on entend par "polypeptide" toute molécule constituée par un enchaînement d'au moins 6 et, de préférence d'au moins 8, acides aminés. Le terme polypeptide comprend aussi bien des molécules peptidiques de courte longueur (de 6 à quelques dizaines de résidus) que des molécules de longueur plus importante (jusqu'à plusieurs centaines de résidus), à la
- 20 condition toutefois de permettre l'utilisation envisagée. On précise qu'un polypeptide en usage dans le cadre de la présente invention peut dériver d'un polypeptide natif tel que trouvé dans la nature, en particulier chez l'homme, ou d'une partie de celui-ci. Il peut également être chimère et comprendre des résidus supplémentaires d'une origine quelconque fusionnés en N et/ou C-terminal et/ou insérés de manière à
- 25 former un cadre de lecture ouvert. On peut également mettre en oeuvre un mutant obtenu par mutation, délétion, insertion et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés par rapport aux séquences divulguées dans les identificateurs de séquence (SEQ ID).

Un polypeptide préféré dans le cadre de la présente invention comprend en

5 outre des éléments appropriés pour assurer son ancrage dans une membrane cellulaire ou sa présentation à la surface d'une cellule. De tels éléments sont connus de l'homme de l'art. A titre indicatif, on mentionne la présence d'un peptide signal généralement associé en position N-terminale et d'une région transmembranaire
10 présentant un degré d'hydrophobicité élevé. Mais on peut également avoir recours à d'autres techniques, par exemple chimiques, pour ancrer ou lier un polypeptide à une membrane ou une surface cellulaire.

Par "séquence d'acides aminés homologue", on entend une séquence présentant un degré d'homologie d'au moins 70 %, de manière avantageuse, d'au moins 80 %,
10 de manière préférée, d'au moins 90 % avec au moins 6 acides aminés continus d'une des séquences citées. Le terme identique fait référence à 100 % d'homologie. L'homme du métier connaît les règles générales qui permettent de calculer le degré d'homologie entre deux séquences. On procède généralement par alignement des séquences éventuellement à l'aide de programmes d'ordinateur spécialisés. Il peut
15 être nécessaire d'introduire artificiellement des emplacements vacants. Une fois que l'alignement optimal est réalisé, le degré d'homologie est établi en comptabilisant toutes les positions dans lesquelles les acides aminés des deux séquences se retrouvent à l'identique, par rapport au nombre total de positions.

Par "attachement d'un adénovirus à une cellule hôte", on entend la liaison de
20 la particule virale à la cellule. Par "entrée d'un adénovirus au sein d'une cellule hôte", on désigne la pénétration du virus à l'intérieur de la cellule hôte. L'attachement et/ou l'entrée sont de préférence médié(s) au moins en partie par le(s) polypeptide(s) en usage dans le cadre de la présente invention par interaction avec la capsid adénovirale. Bien entendu, d'autres molécules polypeptidiques ou non peuvent
25 également participer à ces processus reconnus dans le domaine de l'art comme complexes et multifactoriels. Ils peuvent être évalués par toute technique de l'art, telles que celles décrites ci-après mettant en oeuvre une lignée cellulaire permissive et des particules marquées radioactivement ou exprimant un gène reporter par exemple le gène de la luciférase. A 0°C, seul l'attachement peut avoir lieu, la

- 6 -

pénétration virale nécessitant une température de 37°C.

Aux fins de la présente invention, un adénovirus peut être d'origine humaine ou animale (canine, aviaire, bovine...) ou hybride comprenant des fragments de génome. Ces virus et leur génome sont décrits dans la littérature (voir par exemple
5 Graham et Prevec, Methods in Molecular Biology, Vol 7 ; Gene Transfer and Expression Protocols ; Ed : E.J. Murray, 1991, The Human Press Inc., Clinton, NJ). On préfère mettre en oeuvre un adénovirus recombinant défectif pour la réplication et exprimant notamment un gène d'intérêt thérapeutique. Avantagusement, le génome adénoviral est modifié par délétion ou mutation de séquences essentielles
10 à la réplication et, en particulier, comprises dans les régions E1, E2, E4 et/ou L1-L5 (voir par exemple la demande internationale WO 94/28152).

Selon une première variante, la présente invention a pour objet l'utilisation d'un polypeptide comprenant une séquence en acides aminés homologue ou identique à au moins 6 acides aminés continus de la séquence telle que montrée dans la SEQ ID
15 NO: 1 commençant avec le résidu leucine en position 1 et finissant avec le résidu glutamine en position 25.

De manière avantageuse, un polypeptide en usage dans le cadre de la présente invention comprend une séquence en acide aminé homologue ou identique à tout ou partie d'un antigène du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MHC-I)
20 et, de préférence, de la chaîne lourde de ce dernier.

Toutes les cellules d'un organisme présentent sur leur membrane des molécules appelées antigènes d'histocompatibilité qui définissent chaque individu. Les gènes correspondants, plus d'une dizaine, sont localisés sur le chromosome 6 chez l'homme et présentent un polymorphisme important, ce qui permet d'assurer une grande
25 variabilité de ces marqueurs d'identité. Il existe deux catégories différentes de ces antigènes d'histocompatibilité, respectivement de classe I et II, dont la structure et les fonctions sont distinctes. Les molécules de classe I, appelées HLA (pour Human Leukocyte Antigen en anglais) interviennent pour présenter les peptides antigéniques à la surface cellulaire et jouent un rôle essentiel dans les réponses immunitaires

antivirales exercées par les lymphocytes T cytotoxiques.

Les molécules MHC-I sont des hétérodimères composés d'une chaîne légère non MHC désignée $\beta 2$ -microglobuline ($\beta 2m$) et d'une chaîne lourde codée par les gènes MHC, liées de manière non covalente. La chaîne lourde est une protéine
5 membranaire dont la partie N-terminale est orientée à l'extérieur de la cellule alors que la portion C-terminale est cytoplasmique. La première comprend 3 domaines désignés $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ d'environ 90 acides aminés chacun. Elle est suivie d'une région transmembranaire d'environ 25 acides aminés puis de la région C-terminale d'une trentaine d'acides aminés. La plupart des variations entre les produits des différents
10 allèles sont localisées dans les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$, le domaine $\alpha 3$ étant relativement conservé et la $\beta 2m$ invariable (pour une revue et la comparaison de séquence entre les membres des MHC-I, voir Bjorkman et Parham, 1990, Annu. Rev. Biochem. 59, 253-288).

Parmi les polypeptides convenant aux fins de la présente invention, on peut
15 citer plus particulièrement les antigènes HLA A, B, C, D, E et F ou des polypeptides en dérivant.

D'une manière particulièrement avantageuse, le polypeptide en usage dans le cadre de la présente invention comprend une séquence homologue ou identique à tout ou partie de la région C-terminale du domaine $\alpha 2$ de la chaîne lourde des MHC-
20 I et, plus particulièrement, à la partie centrée sur le résidu tryptophane en position 167, notamment celle s'étendant des résidus 156 à 180 (SEQ ID NO: 1). La numérotation à laquelle il est fait référence est conforme à celle utilisée par exemple dans Bjorkman et Parham (1990, *supra*).

Selon une autre variante, un polypeptide en usage dans le cadre de la présente
25 invention comprend une séquence en acides aminés homologue ou identique à au moins 6 acides aminés continus de la séquence telle que montrée :

- dans la SEQ ID NO: 2 commençant avec le résidu asparagine en position 1 et finissant avec le résidu asparagine en position 26,
- dans la SEQ ID NO: 3 commençant avec le résidu valine en position 1 et

finissant avec le résidu asparagine en position 25,

- dans la SEQ ID NO: 4 commençant avec le résidu sérine en position 1 et finissant avec le résidu arginine en position 25, et/ou
 - dans la SEQ ID NO: 5 commençant avec le résidu asparagine en position 1 et
- 5 finissant avec le résidu sérine en position 25...

Un polypeptide préféré comprend une séquence en acides aminés homologue ou identique à la fibronectine et, en particulier, à l'un au moins de ses modules de type III et, notamment, aux modules FNIII 1, 4, 5 et/ou 14. Bien entendu, il peut en comprendre plusieurs. On peut également envisager l'utilisation de la fibronectine

10 humaine ou d'un peptide en dérivant, par exemple par mutation ou fragmentation. A titre d'information, la fibronectine codée par un gène unique est une molécule intervenant dans les phénomènes d'adhésion et de contact cellulaire. Sa séquence et ses caractéristiques sont décrites dans la littérature accessible à l'homme du métier (voir en particulier Bork et Doolittle, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 8990-

15 8994 et Dickinson et al., 1994, 236, 1079-1092). Elle est composée de 14 modules dits de type III (numérotés de 1 à 14) dont la séquence primaire peut varier mais dont la conformation en feuillet β est conservée.

Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, un polypeptide tel que défini ci-dessus est plus particulièrement destiné à permettre ou faciliter

20 l'attachement d'un adénovirus de sérotype C à une cellule hôte et/ou son entrée dans cette dernière. Parmi les adénovirus envisageables, on peut citer plus particulièrement les sérotypes 2 et 5.

La présente invention concerne également une cellule hôte capable d'exprimer un polypeptide en usage dans le cadre de la présente invention et son utilisation pour

25 permettre ou faciliter l'attachement d'un adénovirus à sa surface et/ou l'entrée dudit adénovirus. Divers types de cellules hôtes peuvent être considérés. Il peut s'agir de cellules d'une origine quelconque, par exemple de microorganismes, levures, insectes, plantes, animales. On préférera notamment une cellule de mammifère et, en particulier, une cellule humaine de type primaire, tumorale ou issue d'une lignée

cultivable *in vitro*. Elle peut avoir une origine hématopoïétique (cellule souche totipotente, leucocyte, lymphocyte, monocyte, macrophage...), hépatique, rénale, du système nerveux central, fibroblaste, épithéliale, pulmonaire ou musculaire (myocyte, myoblaste, cellule satellite, cardiomyocyte...). Une cellule particulièrement préférée est ou dérive de la lignée 293 établie à partir de cellules de rein embryonnaire par intégration de la région adénovirale E1 (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36, 59-72). On indique que l'expression d'un ou plusieurs polypeptides en usage dans le cadre de la présente invention à la surface d'une cellule hôte n'exprimant pas habituellement les MHC-I et/ou la fibronectine devrait permettre son infectivité par un adénovirus. Elle pourrait être utilisée comme nouvelle cellule productrice de vecteurs adénoviraux. On peut également envisager le cas d'une surexpression dans une cellule exprimant naturellement ledit polypeptide. Une lignée de surexpression dérivant de la lignée 293 devrait permettre d'améliorer les rendements de production d'un adénovirus d'intérêt. Bien entendu, le polypeptide en usage dans le cadre de la présente invention peut être associé à la cellule par des moyens chimiques ou par l'intermédiaire d'un ligand reconnaissant une protéine de surface cellulaire. Mais, on peut également envisager une expression par les techniques de l'ADN recombinant. Un tel mode de réalisation est à la portée de l'homme de l'art. A titre indicatif, la séquence nucléotidique codant pour le polypeptide en question peut être isolée (par les techniques standards de PCR ou clonage) ou synthétisée chimiquement avant d'être insérée dans un vecteur d'expression conventionnel sous le contrôle d'éléments de régulation appropriés, le vecteur étant introduit dans la cellule hôte par toute technique de l'art. La cellule hôte en usage dans le cadre de la présente invention peut également être modifiée de manière à compléter un adénovirus défectif par transfection de fragment(s) approprié(s) de génome adénoviral.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un ligand capable d'influencer l'attachement d'un adénovirus à une cellule hôte et/ou son entrée au sein de cette dernière médiés par un polypeptide tel que défini ci-dessus. Le ligand en usage dans l'invention peut être de nature quelconque. On peut citer par exemple les

peptides, les hormones, les anticorps ou leurs dérivés et, notamment, les anticorps simple chaîne de type scFv (pour single chain fragment variable en anglais) et les récepteurs solubles dépourvus de leur région transmembranaire. En particulier, un tel ligand peut dériver d'un polypeptide en usage dans la présente invention.

- 5 Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, le ligand peut avoir une influence négative (antagoniste) ou positive (agoniste). De préférence, un ligand préféré présente une constante de dissociation à l'égard de l'adénovirus comprise entre 0,01 et 100 nM, avantageusement entre 0,1 et 50 nM et, de manière tout à fait préférée, entre 0,5 et 10 nM.

- 10 Dans le cas d'un antagoniste, l'interaction du ligand avec la fibre permettra de diminuer ou inhiber les processus d'attachement et/ou d'entrée d'un adénovirus. Dans ce contexte, un ligand particulièrement préféré est basé sur un polypeptide tel que défini dans la SEQ ID NO: 1. A titre d'exemple, on peut citer un polypeptide comprenant une séquence en acides aminés homologue ou identique à au moins 6
15 acides aminés continus compris dans la séquence telle que montrée dans la SEQ ID NO: 6 commençant avec le résidu arginine en position 1 et finissant avec le résidu arginine en position 20. On préférera avoir recours au peptide désigné MH20 dans les exemples qui suivent.

- Dans le cas d'une influence positive, le ligand en usage dans le cadre de la
20 présente invention est utilisé pour permettre ou stimuler l'attachement et/ou l'entrée des adénovirus. Un ligand convenant aux fins de l'invention comprend une séquence en acides aminés homologue ou identique à au moins 6 acides aminés continus de la séquence telle que montrée dans la SEQ ID NO: 7 commençant avec le résidu arginine en position 1 et finissant avec le résidu sérine en position 20. Un exemple
25 préféré consiste en le peptide désigné ci-après FN20.

La présente invention a également trait à un ligand comprenant une séquence en acides aminés homologue ou identique à au moins 6 acides aminés continus de la séquence telle que montrée dans la SEQ ID NO: 6 ou 7.

Mais, il peut également s'agir d'un ligand d'origine adénovirale. Selon ce mode

de réalisation, un ligand préféré dérive de la fibre d'un adénovirus, en particulier, de la partie de la tête interagissant avec les polypeptides précités. Un motif peptidique choisi dans cette région devrait donc influencer l'infectivité des adénovirus à l'égard d'une cellule hôte exprimant le polypeptide. Avantageusement, on a recours à un

5 ligand recouvrant les résidus 438 à 486 de la fibre d'un adénovirus. Plus particulièrement, un ligand d'un polypeptide tel que défini par la SEQ ID NO: 1 dérive de préférence d'un Ad5 et comprend une séquence en acides aminés homologue ou identique à au moins 6 acides aminés continus de la séquence telle que montrée dans la SEQ ID NO: 8, débutant à l'acide aminé leucine en position 1

10 et se terminant à l'acide aminé acide aspartique en position 18. Un ligand également envisageable peut dériver de la fibre d'un adénovirus de sérotype 2 et comprendre une séquence en acides aminés homologue ou identique à au moins 6 acides aminés de la séquence telle que montrée dans la SEQ ID NO: 9 débutant au résidu thréonine en position 1 et se terminant au résidu valine en position 16.

15 Le ligand d'un polypeptide tel que défini par les SEQ ID NO: 2 à 5 est plus particulièrement caractérisé par une séquence en acides aminés homologue ou identique à au moins 6 acides aminés de la séquence telle que montrée dans la SEQ ID NO: 10 débutant au résidu leucine en position 1 et se terminant au résidu thréonine en position 14 (Ad5) ou dans la SEQ ID NO: 11 débutant au résidu

20 asparagine en position 1 et se terminant au résidu asparagine en position 13 (Ad2).

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un ligand selon l'invention, pour la préparation d'un médicament destiné à inhiber ou diminuer une infection par un adénovirus. Dans ce contexte, on préférera l'usage d'un ligand antagoniste dans un but thérapeutique ou prophylactique. L'utilisation d'un ligand

25 selon l'invention, de préférence agoniste, convient à la préparation d'un médicament destiné à favoriser ou faciliter une infection par un adénovirus, et, en particulier, d'un adénovirus recombinant porteur d'un gène thérapeutique à visée de thérapie génique (curative) ou anti-virale (SIDA) ou anti-cancéreuse. Un tel médicament trouve son utilité par exemple en association avec les traitements de thérapie génique afin

d'améliorer l'infection virale chez un patient traité par un adénovirus recombinant. On peut envisager une voie d'administration parentérale, orale ou encore par aérosol. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. Le dosage et la formulation appropriés varient en
5 fonction de différents paramètres, par exemple de l'individu, de la maladie à traiter, de l'effet désiré, de la voie d'administration ou encore de l'adénovirus en cause.

La présente invention concerne également une méthode pour sélectionner ou identifier un récepteur cellulaire d'un virus dans un échantillon approprié, comprenant :

- 10 (a) l'immobilisation sur un support inerte d'un réactif d'origine virale comprenant tout ou partie d'une protéine de surface dudit virus déterminant son attachement au récepteur cellulaire,
- (b) l'incubation pendant un temps déterminé avec l'échantillon,
- (c) l'élution de l'échantillon retenu à l'étape (b) avec tout ou partie d'un anticorps
15 dirigé contre ledit réactif d'origine virale, et
- (d) l'analyse de l'échantillon élué à l'étape (c).

Le support inerte peut être sans limitation sous une forme quelconque (cône, tube, puits, billes ou analogues) et d'un matériau quelconque (naturel, de synthèse tels que les polymères, modifié chimiquement ou non...). La fixation du réactif sur
20 le support inerte peut être réalisée de manière directe ou indirecte. De manière directe, on procédera de préférence par adsorption c'est à dire de manière non covalente bien que l'établissement de liaisons covalentes puisse également être considéré. De manière indirecte, on peut fixer préalablement un composé anti-réactif capable d'interagir avec le réactif de façon à immobiliser l'ensemble sur le support
25 inerte. Selon un mode de réalisation avantageux, l'échantillon est constitué par une bibliothèque dite aléatoire et, en particulier d'expression (fragments génomiques, cADN) ou peptidique ou, de manière préférée, de phages exprimant des motifs peptidiques (phagotopes). De telles bibliothèques sont décrites dans la littérature ou accessibles commercialement. Dans le but de sélectionner ou identifier un récepteur

cellulaire d'un adénovirus, on met de préférence en oeuvre à titre de réactif d'origine virale, tout ou partie de la fibre et, notamment, de la tête d'un adénovirus et, à titre d'éluant, un anticorps anti-fibre neutralisant (inhibiteur de l'attachement du virus à la surface de la cellule hôte). La fibre ou ses fragments peuvent être produits par

5 voie recombinante et les anticorps par la technique d'hybridome ou par génie génétique (production d'anticorps simple chaîne scFv, Fab...). On indique que la plupart des anticorps anti-fibre sont neutralisants. L'analyse est réalisée par comparaison de la séquence de l'échantillon élué avec les banques de données. Une telle analyse est à la portée de l'homme de l'art.

10 Enfin, la présente invention vise également une méthode pour sélectionner ou identifier la partie d'une protéine virale déterminant l'attachement d'un virus à un récepteur cellulaire dans un échantillon approprié, comprenant :

- (a) l'immobilisation sur un support inerte de tout ou partie d'un anticorps dirigé contre ladite protéine virale,
- 15 (b) l'incubation pendant un temps déterminé avec ledit échantillon,
- (c) l'élution de l'échantillon retenu à l'étape (b) avec un réactif d'origine virale comprenant tout ou partie de ladite protéine virale, et
- (d) l'analyse de l'échantillon élué à l'étape (c).

Les modes de réalisation spécifiques cités précédemment peuvent également

20 s'appliquer dans ce contexte.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un ligand bifonctionnel pour le ciblage d'un adénovirus vers une protéine de surface cellulaire autre que le récepteur cellulaire naturel dudit adénovirus, ledit ligand bifonctionnel comportant une première partie ligand capable d'interagir avec la fibre dudit

25 adénovirus, une deuxième partie ligand capable d'interagir avec ladite protéine de surface cellulaire et, éventuellement, un espaceur entre lesdites première et deuxième parties ligand.

Au sens de la présente invention, un ligand bifonctionnel est capable d'interagir avec deux entités différentes l'une de préférence située à la surface d'un adénovirus

et l'autre à la surface d'une cellule hôte, au niveau d'une protéine de surface cellulaire autre que le récepteur cellulaire naturel dudit adénovirus. Par ailleurs, les deux parties ligands peuvent être éventuellement séparées par un espaceur comprenant de 1 à une quinzaine d'acides aminés, de préférences non chargés. Bien entendu, l'ordre des entités n'a pas d'importance, le domaine interagissant avec la protéine adénovirale pouvant être en N ou en C-terminal du ligand bifonctionnel, la position C-terminale étant préférée. L'utilisation d'un tel ligand bifonctionnel permet de cibler un adénovirus vers une cellule hôte d'intérêt, par exemple une cellule tumorale, une cellule infectée, un type cellulaire particulier ou une catégorie de cellules portant un marqueur de surface spécifique. Après liaison dudit ligand bifonctionnel à la protéine de surface cellulaire, l'entité reconnaissant la protéine adénovirale est exposée, ce qui devrait créer des «leures» de récepteurs viraux du même type que les récepteurs primaires (domaine $\alpha 2$ des MHC-I) et créer ou augmenter le nombre de récepteurs primaires d'adénovirus à la surface de la cellule hôte.

De préférence, la partie ligand interagissant avec la fibre adénovirale présente les caractéristiques du ligand défini précédemment, elle est notamment dérivée du domaine $\alpha 2$ du MHCI et comprend de préférence une séquence en acides aminés homologue ou identique à au moins 6 acides aminés continus compris dans la SEQ. ID NO: 6. De manière encore plus préférée, elle est constituée par le peptide MH20 (SEQ ID NO: 6).

Pour ce qui est de la partie ligand interagissant avec la protéine de surface cellulaire, celle-ci est adaptée à la cellule hôte que l'on désire cibler. S'agissant d'une cellule infectée par le virus HIV (Human Immunodeficiency Virus), le ligand peut être un fragment d'anticorps contre la fusine, le récepteur CD4 ou contre une protéine virale exposée (glycoprotéine d'enveloppe) ou encore la partie de la protéine TAT du virus HIV s'étendant des résidus 37 à 72 ; (Fawell et al. 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 664-668). S'agissant d'une cellule tumorale, le choix se portera sur un ligand reconnaissant un antigène spécifique de tumeur (MUC-1 dans le cas du cancer du sein, antigènes du papilloma virus HPV ... etc) ou

surexprimé (récepteur à l'IL-2 surexprimé dans certaines tumeurs lymphoïdes). Si l'on désire cibler les lymphocytes T, on peut employer un ligand du récepteur de cellule T. Par ailleurs, la transferrine est un bon candidat pour un ciblage hépatique. On peut également citer le peptide EGF (abréviation de Epidermal Growth Factor) permettant le ciblage vers les cellules exprimant le récepteur à l'EGF ou le peptide GRP (pour Gastrin Releasing Peptide) de séquence GNHWAVGHLM (Michael et al., 1995, Gene Ther. 2, 660-668) se liant au récepteur cellulaire GRP. D'une manière générale, les ligands qui peuvent être utilisés dans le contexte de l'invention sont largement décrits dans la littérature.

- 10 Un ligand bifonctionnel en usage dans le cadre de la présente invention peut être obtenu par les techniques de l'ADN recombinant, par synthèse ou par couplage chimique des deux parties ligands en question. De préférence, l'adénovirus à cibler est recombinant et porte un gène cytotoxique ou capable d'induire l'apoptose cellulaire. De tels gènes sont parfaitement connus. On peut citer en particulier le
- 15 gène codant pour la thymidine kinase du virus HSV-1 (Virus de l'herpès simplex de type 1).

- A titre d'exemples préférés, on peut citer un ligand bifonctionnel comprenant le peptide MH20 et le GRP. Les domaines peptides MH20 et GRP peuvent être orientés de façon inversée : respectivement MH20-GRP lorsque le MH20 est en
- 20 position N-terminale et GRP-MH20 lorsque le MH20 est en position C-terminale. Un autre mode de réalisation met en oeuvre un ligand ayant une entité MH20 et une entité anticorps de type ScFv (Single Chain Fv fragment). Selon un mode de réalisation particulièrement préféré, ledit ligand bifonctionnel comprend une séquence en acides aminés homologue ou identique à tout ou partie de la séquence
- 25 telle que montrée :

- (i) dans la SEQ ID NO: 22 débutant au résidu arginine en position 1 et finissant avec le résidu méthionine en position 35, ou
- (ii) (ii) dans la SEQ ID NO: 23 débutant au résidu lysine en position 1 et finissant avec le résidu arginine en position 35.

La présente invention concerne également un ligand bifonctionnel tel que défini ci-avant et, en particulier, les ligands GRP-MH20 ou MH20-GRP. Le ligand GRP-MH20 est particulièrement préféré.

La présente invention a également pour objet une cellule portant à sa surface un tel ligand bifonctionnel. L'avantage d'une telle cellule est d'augmenter le nombre de récepteurs primaires de type MHC1- α 2. Ladite cellule est avantageusement une cellule de mammifère d'une origine quelconque (voir ci-dessus). Il s'agit de préférence d'une cellule de complémentation d'un adénovirus défectif de la fonction E1 et éventuellement d'une autre fonction (E2, E4, E2 et E4, etc..., voir la demande WO94/28152). Un exemple préféré est la lignée 293. Elle peut être générée par les techniques de l'ADN recombinant (expression du ligand bifonctionnel au moyen d'un vecteur approprié comportant les éléments permettant l'expression à la surface cellulaire, par exemple séquence signal et/ou région transmembranaire), par liaison chimique covalente ou non ou par simple interaction entre la cellule et le ligand.

La présente invention est illustrée par référence aux figures suivantes :

La Figure 1 présente les phagotopes obtenus après biorpaillage utilisant l'anticorps 1D6.3 (a) ou 7A2.7 (b) à titre de ligand. Les motifs peptidiques des phagotopes sont alignés par rapport à la séquence de la tête d'Ad5 (le résidu méthionine initiateur de la fibre représentant le +1. Les régions formant des structures feuillets β (Xia et al., 1994, *supra*) sont soulignées et indiquées par (D), (E) et (F). Les résidus identiques ou conservés dans les séquences sont indiqués en gras.

La Figure 2 présente les phagotopes obtenus après biorpaillage utilisant (a) l'anticorps 7A2.7 ou (c) 1D6.3 à titre d'éluant, (b) et (d) les séquences consensus déterminées à partir des phagotopes (a) et (c) respectivement ainsi que les séquences homologues trouvées par analyse de la banque de données SWISS PROT. Les résidus conservés à des positions analogues sont indiqués en gras.

La Figure 3 illustre l'expression du gène luciférase dans les cellules HeLa infectées avec le virus Ad5Luc3 à une MOI constante ($0,16 \text{ ffu}/10^5$ cellules).

(○) l'Ad5Luc3 est ajouté aux cellules refroidies à 0°C en présence de molarités croissantes de peptide (a) FN20 (0 à 500 µM) ou (b) MH20 (0 à 50 µM). Les témoins correspondent à l'incubation des peptides après l'attachement de l'Ad5Luc3 (Δ) ou après l'endocytose (□).

5 La Figure 4 illustre l'expression du gène luciférase dans les cellules Daudi-HLA- (●) ou Daudi-HLA+ (○) infectées avec des concentrations croissantes d'Ad5Luc3 (0,3 à 150 ffu/10⁵ cellules). L'Ad5Luc3 est mis en contact des cellules pré-refroidies à 0°C pendant 1 h afin de permettre l'attachement viral mais pas l'entrée. L'activité luciférase est évaluée après 18 h de culture à 37°C. Les valeurs
10 RLU représentent la moyenne de trois expériences séparées.

La Figure 5 illustre le principe de la méthode du ligand bifonctionnel mimant les récepteurs primaires de l'adénovirus.

La Figure 6 représente l'activité enzymatique luciférase en fonction de la MOI d'Ad5Luc3 sur les cellules NIH (a), Swiss 3T3 (b) et HeLa (c).

15

EXEMPLES

Les cellules HeLa (ATCC CCL2) sont cultivées en monocouches selon les techniques de l'art. On utilise de préférence un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium ; Gibco) contenant 10 % de sérum de veau foetal (FCS) inactivé à
20 la chaleur, de la L-glutamine et des antibiotiques habituels. Les cellules Daudi HLA- (ATCC CCL213) et HLA+ (Quillet et al., 1988, J. Immunol. 141, 17-20) sont maintenues dans du milieu RPMI 1640 (Gibco) supplémenté avec 15 % de FCS.

L'Ad5 sauvage et l'Ad5Luc3 recombinant sont propagés dans les cellules HeLa par les techniques standards. A titre indicatif, Ad5Luc3 est un adénovirus compétent
25 pour la réplication qui contient le gène luciférase placé sous le contrôle du promoteur précoce du virus SV40 (Virus simien 40) inséré dans la région E3 du génome adénoviral (Mittal et al., 1993, Virus Research 28, 67-90).

EXEMPLE 1 : Production d'anticorps monoclonaux (mAb) capable d'inhiber

l'attachement de l'Ad5 aux cellules permissives.

Les mAbs murins 1D6.3 et 7A2.7 ont été générés par les techniques classiques en injectant la tête de la fibre d'Ad5 produite dans les bactéries par voie recombinante (Henry et al., 1994, J. Virol. 68, 5239-5246 ; Douglas et al., 1996, Nature Biotech 14, 1574-1578) à des souris Balb/C. La fusion et l'obtention de clones d'hybridomes sont des techniques conventionnelles à la portée de l'homme de l'art. Les clones sécrétant sont sélectionnés par leur reconnaissance de l'antigène qui a servi à l'immunisation en ELISA. On indique qu'ils présentent une activité neutralisante à l'égard des virions (Michael et al., en préparation).

Séro-réactivité des anticorps monoclonaux 1D6.3 et 7A2.7.

La réactivité des anticorps est testée à l'égard du domaine de la tête de la fibre de 3 sérotypes différents (Ad2, Ad5 et Ad3) préparé par voie recombinante. Les séquences correspondantes sont isolées par PCR (Polymérase Chain Reaction) à partir d'ADN génomique viral puis introduites dans le virus AcNPV (*Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus) sous le contrôle du promoteur polyhedrine (Luckow et Summer, 1989, Virology 170, 31-39). Les protéines recombinantes sont exprimées dans les cellules d'insecte Sf9 (*Spodoptera frugiperda*). La technologie générale est détaillée dans Karayan et al. (1994, Virology 202, 782-796) et Novelli et Boulanger (1991, Virology 185, 365-376). Plus précisément, les séquences Ad5 portant le dernier motif répété de la tige suivi de la tête de la fibre, sont clonées à l'aide des amorces représentées aux SEQ ID NO: 12 et 13. L'amorce sens correspond aux nucléotides 32164 à 32205 du génome Ad5 (Chroboczek et Jacrot, 1987, Virology 161, 549-554), inclut 4 mismatch de manière à créer un site *Bam*HI et à remplacer la thréonine en position 388 de la fibre native par un codon ATG initiateur. L'amorce antisens correspond aux nucléotides 32919 à 32883 du génome Ad5 et permet de créer un site *Kpn*I pour faciliter les étapes ultérieures de clonage. La protéine recombinante récoltée dans les surnageants de cellules Sf9 est désignée

F5-AT386. La tête de l'Ad2 est produite à partir du vecteur baculovirus décrit dans Louis et al. (1994, J. Virol. 68, 4104-4106). Le produit d'expression désigné F2-AT388 débute en position 388 (par remplacement de l'Ala de la séquence native par une Met) et porte, outre le domaine de la tête, le dernier motif répété de la tige.

5 Enfin, pour les séquences correspondantes de l'Ad3, on utilise une amorce sens (SEQ ID NO: 14) conçue pour introduire un site de clonage *NcoI* et remplacer les codons Asn et Ser en position 124 et 125 par des codons Met et Ala respectivement. L'amorce antisens (SEQ ID NO: 15) introduit un site *KpnI*. Le produit d'expression est désigné F3-AT124.

10 Les cupules d'une plaque ELISA sont recouvertes par la protéine recombinante F5-AT386, F2-AT388 ou F3-AT124 sur laquelle on fait réagir le mAb 1D6.3 ou 7A2.7 puis un anticorps anti-souris marqué (par exemple à la phosphatase ou la peroxydase). Une réaction positive est observée à l'égard de la protéine recombinante F5-AT386 native. Aucune réaction n'est détectée dans les puits contenant la protéine
15 F5-AT386 dénaturée au SDS ni ceux contenant les produits F2-AT388 et F3-AT124 natifs ou dénaturés. Ces données suggèrent que ces anticorps reconnaissent un épitope conformationnel spécifique du sérotype C.

*Effet inhibiteur des anticorps monoclonaux 1d6.3 et 7A2.7 sur l'attachement
20 cellulaire de l'Ad5.*

On procède à un test de microliaison sur cellules HeLa en culture à l'aide de virions Ad5 marqués à la valine [^{14}C] (activité spécifique de 2200 à 2500 cpm/ 10^8 virions) suivi d'une autoradiographie *in situ* (Silver et Anderson, 1988, Virology 165, 377-387). Pour ce faire, les cellules à l'état de semi confluence sont mises en
25 présence d'une quantité constante de virions radioactifs (10^3 cpm pour 5×10^4 cellules) à une multiplicité d'infection (MOI) de 1000 virions par cellule pendant 1 h à 0°C en présence de mAb 1D6.3 ou 7A2.7 (dilutions au 1:10, 1:8, 1:4 et 1:2 des surnageants d'hybridomes respectifs dont la concentration en mAb est estimée à 0,1-0,2 µg/ml, ce qui correspond à un excès en mAb par rapport aux virions présents

- 20 -

dans l'innoculum de 100, 250, 500 et 1000 respectivement). Les cellules sont ensuite lavées en présence de PBS, fixées par 0,1 % de paraformaldéhyde dans du PBS, séchées et recouvertes par l'émulsion K4 sous forme de gel (Ilford Nuclear Research). Après une exposition d'une semaine et développement (agent de développement D19B, Kodak), les échantillons sont colorés brièvement par 0,5 %
5 de bleu de toluidine repris dans H₂O et examinés sous microscope. La densité des grains d'argent réduit autour du contour des cellules est représentatif du nombre de virions [¹⁴C] liés à la surface cellulaire.

En l'absence de mAb anti-tête ou à une concentration faible (dilution 1:10), un
10 halo sombre de grains d'argent réduit est visible autour des cellules indiquant une adsorption des virions à leur surface. Une réduction du halo dépendante de la concentration en mAb est observée pour les dilutions 1:8, 1:4 et 1:2. Ces résultats traduisent un blocage de la liaison de la tête adénovirale au récepteur cellulaire primaire dû aux mAb 1D6.3 et 7A2.7 dirigés contre cette partie de la fibre. Une
15 comparaison de la surface des halos pour les mêmes dilutions montre que l'anticorps 1D6.3 est plus inhibiteur de l'attachement de l'Ad5 au récepteur cellulaire des HeLa que le mAb 7A2.7.

EXEMPLE 2 : Identification des épitopes des mAb 1D6.3 et 7A2.7.

20

Les épitopes de la fibre étant présumés être conformationnels (Fender et al., 1995, Virology 214, 110-117), la méthode classique d'identification des épitopes par balayage de peptides n'est pas appropriée. On procède selon une technique de biopailage dérivée de celles décrites par Smith et Scott (1993, Methods Enzymol.
25 217, 228-257) et Hong et Boulanger (1995, EMBO J. 14, 4714-4727). Dans ce cas, le mAb 1D6.3 ou 7A2.7 est adsorbé une nuit à 4°C sur une plaque de microtitration (Nunc Immunomodule MaxiSorp F8) à une concentration de 1 µg/puits dans un tampon carbonate de sodium 0,1 M pH9,6. Les anticorps immobilisés sont mis en contact d'une bibliothèque de phages exprimant des hexapeptides (phages fUSE5 ;

Scott et Smith, 1990, Science 249, 386-390). Dans une seconde étape les phages retenus sont élués soit par un tampon d'élution acide conventionnel soit, plus sélectivement, par compétition en présence d'un excès de protéine recombinante F5-AT386. Les motifs hexapeptidiques (phagotopes) portés par les phages élués sont
5 déterminés par séquençage de la protéine pIII fUSE5 par la méthode de Sanger et al. (1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467). Les homologues de séquences avec les phagotopes sont recherchées dans la banque de données Swiss Prot et le programme FASTA 1.6 (Pearson et Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444-2448) et les alignements de séquences réalisées en utilisant la version W(1;4)
10 du programme Clustal (Higgins et Sharp, 1988, Gène 73, 237-244).

Comme le montre la Figure 1, le mAb 1D6.3 retient différents phagotopes dont les séquences se chevauchent, et sont homologues à la tête d'Ad5 s'étendant entre les résidus Val en position 438 et Asp en position 462. En dépit d'un certain degré de dégénération et de dispersion, on a pu déterminer un motif central de séquence
15 LAPISGTVQSAHLIRFD correspondant aux acides aminés en positions 445 à 462 (SEQ ID NO: 8). Ce motif est centré sur le résidu His en position 456, ce qui corrobore la présence d'histidine dans plusieurs phagotopes indépendants. De plus, trois phagotopes contiennent une histidine proche d'une sérine (GISHTG et GASHTV) et une séquence homologue est trouvée dans la tête (⁴⁵³QSAHLI⁴⁵⁸). Du
20 côté N-terminal, la séquence LAPIS est représentée dans plusieurs phagotopes sous la forme L-P, VAP-S et LIPFNS.

Les analyses de séquence des 15 phagotopes retenus par le mAb 7A2.7, ont mises en évidence la présence d'une proline à 4 reprises, de tryptophane et histidine 8 fois et l'association dans le même phagotope de deux résidus aromatiques est
25 trouvée 5 fois. Il semble donc que l'épitope du mAb 7A2.7 contienne un résidu proline, tel que celui en position 475 de la fibre, à proximité d'un groupe de résidus aromatiques, tel que ⁴⁷⁷YWNF⁴⁸⁰. En outre, deux phagotopes FWLAVR et WALFRS sont homologues au motif ⁴⁷⁷YWNFR⁴⁸¹. Sur la base de ces données, l'épitope du mAb 7A2.7 a été cartographié entre les résidus 473 et 486 de la fibre

Ad5 (SEQ ID NO: 10).

En résumé, les mAb 1D6.3 et 7A2.7 reconnaissent des segments adjacents de 15 à 20 aa dans la séquence linéaire de la tête d'Ad5, les résidus s'étendant des positions 445 à 462 et 473 à 486 respectivement. Selon le modèle tridimensionnel de la tête proposé par Xia et al. (1994, Curr. Biol. Structure 2, 1259-1270), les deux épitopes occupent des régions continues d'un point de vue spatial. L'épitope du mAb 1D6.3 recouvre une partie de la boucle CD et du feuillet β D, alors que l'épitope du mAb 7A2.7 est localisé au niveau du segment adjacent DE et des deux feuillets β E et F. L'épitope 1D6.3 se situe à l'intérieur d'un feuillet R alors que l'épitope 7A2.7 est orienté plus latéralement par rapport au feuillet R.

EXEMPLE 3 : Identification des récepteurs cellulaires de l'Ad5 par la technique de biorpaillage réverse.

Cette technique est dite réverse par rapport à la précédente puisqu'on utilise la fibre comme ligand et le mAb comme éluant. On procède donc par immobilisation de la tête de la fibre de l'Ad5 sur laquelle on fait réagir la bibliothèque de phages exprimant des phagotopes hexapeptidiques. Les phages adsorbés peuvent être élués soit par un tampon acide conventionnel soit par le mAb 1D6.3 ou 7A2.7 et la protéine pIII recombinante portant leurs phagotopes respectifs est séquencée. La recherche dans les banques de données est effectuée comme ci-dessus. Les motifs hexapeptidiques identifiés sont présentés à la Figure 2.

Les phagotopes produits par compétition avec le mAb 7A2.7 sont présentés à la Figure 2a. Leur analyse permet de dériver une séquence consensus (Figure 2b) qui présente une homologie avec les motifs 1, 3, 5 et 14 du module de type III de la fibronectine humaine (SEQ ID NO: 2 à 5) (Main et al., 1992, Cell 71, 671-678). Ces derniers se situent au niveau du feuillet β B et de la boucle adjacente BC du module FNIII (Dickinson et al., 1994, J. Mol. Biol. 236, 1079-1092).

Les phagotopes élués après action du mAb 1D6.3 sont décrits à la Figure 2c.

L'ensemble des séquences se chevauchent et permettent de déterminer également une séquence consensus (Figure 2d). La recherche d'homologie avec les séquences répertoriées dans les banques de données révèle une homologie avec la région C-terminale du domaine α -2 de la chaîne lourde des molécules MHC de classe I (MHC-I α -2) (position 156 à 180) (SEQ ID NO: 1).

EXEMPLE 4 : Interactions de la fibre adénovirale avec le module FNIII et le domaine MHC-I α -2

10 L'interaction est étudiée *in vitro* à l'aide d'une protéine chimère issue de la fusion C-terminale de la protéine GST (Glutathion S-transférase) à un pentadécapeptide RHILWTPANTPAMGY reproduisant la séquence consensus homologue au feuillet β B et la boucle BC de FNIII (voir exemple précédent et Figure 2b). Pour ce faire, les oligonucléotides présentés aux identificateurs de
15 séquences 16 et 17 sont hybridés et introduits dans le site *Xho*I du plasmide pGEX-KG (Guan et Dixon, 1991, Anal. Biochem. 192, 262-267). Il est à noter que les oligonucléotides une fois réhybridés génèrent un site *Xho*I à l'extrémité 5' si l'insert est cloné dans l'orientation correcte. Ceci permet d'intégrer une seule copie ou de multiples copies en tandem au niveau du site *Xho*I reconstitué. La séquence du
20 produit de fusion comprenant une copie du pentadécapeptide (désigné GST-FNx1) peut être schématisée de la manière suivante : GST- (site de clivage par la thrombine-PGIS-GGGGG-ILDSMGRLE-RHILWTPANTPAMGY(V)-ELKLNS-stop. Les constructions GST-FNx2 et GST-FNx3 comportent respectivement 2 et 3 répétitions du pentadécapeptide entre les résidus LE et EL de la cassette de
25 clonage.

Les oligonucléotides sens et antisens (SEQ ID NO: 18 et 19) codant pour la séquence consensus obtenue par compétition avec le mAb 1D6.3 (Figure 2d) sont insérés selon la même stratégie que précédemment à l'extrémité C-terminale de la GST pour donner les constructions GST-MHCx1, GST-MHCx2 et GST-MHCx3

selon le nombre de motifs présents. Les protéines chimères GST-FN et GST-MHC sont produites dans *E. coli*, extraites et purifiées par affinité sur des billes d'agarose-glutathion (Sigma) selon les méthodes conventionnelles (Smith et Johnson, 1988, Gene 67, 31-40).

- 5 En parallèle, les fibres complètes des sérotypes 2, 3 et 5 sont produites par voie recombinante selon la technologie baculovirus/cellules Sf9 déjà employée. La construction F2-FL582 portant le gène de la fibre Ad2 est décrite dans Novelli et Boulanger (1991, Virology 185, 365-376). Les séquences codant pour les fibres Ad5 et Ad3 sont isolées par PCR en utilisant l'ADN viral à titre de matrice et des amorces
- 10 sens et antisens appropriées telles que celles reportées aux SEQ ID NO: 20 et 13 et 21 et 15. Le segment amplifié est introduit dans un vecteur baculovirus sous le contrôle du promoteur polyhédrine et le produit d'expression récupéré dans les surnageants de culture. On obtient F5-FL581 et F3-FL320 correspondant aux fibres Ad5 et Ad3 respectivement.
- 15 La capacité du module FNIII et du domaine α -2 MHC-I recombinant à lier la fibre adénovirale est évaluée par immunotransfert après incubation *in vitro* des protéines de fusion GST-FN et GST-MHC et des fibres recombinantes F2-FL582, F5-FL581 et F3-FL320. Les complexes formés sont isolés sur billes d'agarose glutathion dans les conditions décrites par Johnson et al. (1995, J. Biol. Chem. 270,
- 20 24352-24360) puis analysés sur gel de polyacrylamide de 12,5 % (SDS-PAGE) en utilisant un système de tampon discontinu (Laemmli, 1970, Nature 227, 680-685). Les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose (0,8 mA/cm² ; système Cambridge Electrophoresis, UK) dans un tampon Tris-HCl 25 mM, glycine 192 mM, pH8,3 contenant 20 % de méthanol. Après traitement avec une solution de
- 25 blocage (lait écrémé 5 %, sérum de veau 1 % dans du tampon TBS-T : 20 mM Tris-HCl pH7,8, 0,15 M NaCl, 0,05 % Tween 20), la membrane est mise en contact avec l'anticorps 4D2.5 (Hong et Engler, 1991, Virology 185, 758-767) puis un conjugué anti IgG marqué à la peroxydase de raifort. La révélation par le substrat chimiluminescent peroxydase (SuperSignal, Pierce Chemicals) est réalisée selon

Carrière et al. (1995, J. Virol. 69, 2366-2377) et les luminogrammes (Hyperfilm β -max, Amersham) sont analysés à 610 nm à l'aide d'un densitomètre automatique (REP-EDC, Helena Laboratories, Beaumont, TX). A titre indicatif, l'anticorps 4D2.5 reconnaît l'épitope FNPVYP du domaine de la queue conservé chez la plupart des

5 adénovirus mammifères.

GST-FNx1, GST-FNx2 et GST-FNx3 se lient à F5-AT386 et F2-AT388 avec une grande efficacité alors que F3-AT124 est retenu à un moindre niveau. Un comportement similaire est observé avec les protéines chimères GST-MHCx1, GST-MHCx2 et GST-MHCx3 qui retiennent F5-AT386 et F2-AT388 avec une efficacité

10 supérieure à F3-AT124.

La fibre Ad5 se lie aux protéines de fusion GST-FN et GST-MHC et ceci avec une affinité 2 à 3 fois supérieure par rapport à la fibre Ad2 et 10 à 15 fois supérieure par rapport à la fibre Ad3. De plus, l'efficacité de liaison n'est pas dépendante du nombre de motifs présents dans la protéine de fusion, l'intensité étant comparable et

15 même parfois plus faible entre GST-FNx1 et GST-FNx3 et GST-MHCx1 et GST-MHCx3. Ceci peut être expliqué par le fait que les motifs en tandem peuvent adopter une conformation qui nuit à la liaison.

EXEMPLE 5 : Influence des peptides synthétiques dérivés de FNIII et MHC-

20 I α 2 sur l'attachement des virus à la surface cellulaire.

Deux peptides synthétiques reproduisant les motifs FNIII et MHC-I α 2 ont été synthétisés chimiquement et purifiés selon les techniques de l'art. FN20 (SEQ ID NO: 7) reproduit la séquence consensus des phagotopes élus par l'anticorps 7A2.7

25 et MH20 (SEQ ID NO: 6) correspond à celle des phagotopes élus par le mAb 1D6.3.

Les peptides FN20 et MH20 sont testés vis à vis de l'attachement de l'adénovirus rapporteur Ad5Luc3 à des cellules HeLa cultivées *in vitro*. Le test est réalisé en partie à 0°C, une température qui permet l'attachement des virus à la

surface des cellules permissives mais, en revanche, bloque l'entrée des virus et le recyclage des récepteurs. L'Ad5Luc3 (MOI 0,16 pfu/10⁵ cellules) est préalablement incubé avec des quantités croissantes de peptides (0,01 à 500 nM) à température ambiante pendant 2 heures puis le mélange est ajouté à une culture cellulaire placée sur glace. Après 1 h à 0°C, les virus non adsorbés et les peptides sont éliminés par lavage et la culture est poursuivie pendant 18 h à 37°C après ajout d'un milieu préchauffé. Les lysats cellulaires sont préparés de manière conventionnelle et l'activité luciférase exprimée en RLU (pour Relative Light Units en anglais) est déterminée (substrat Promega, Madison, WI ; luminomètre Lumat LB-9501, Brethold Bioanalytical, Wildbad, Allemagne).

Les résultats de compétition avec le peptide FN20 sont présentés à la Figure 3a. Aucun effet significatif n'est obtenu jusqu'à une molarité de 10 µM puis une augmentation progressive de l'activité luciférase apparaît au delà de 25 µM. En particulier, l'activité croît d'un facteur 100 entre 25 et 100 µM. Le peptide FN20 a donc un effet stimulateur de l'attachement viral. Il ne confère aucune cytotoxicité apparente et n'a pas d'effet négatif sur l'expression du gène luciférase une fois le virus préattaché (peptide ajouté à la culture cellulaire après l'étape d'attachement viral à 0°C) ou préendocytosé (peptide ajouté à la culture cellulaire après l'étape d'attachement et de pénétration du virus).

Dans le cas du peptide MH20 (Figure 3b), on observe une légère augmentation de l'expression du gène luciférase pour les molarités comprises entre 0,05 et 2,5 µM (activité 5 à 6 fois plus élevée à 2,5 µM). Ce phénomène est suivi d'une diminution rapide des niveaux de luciférase lorsque les molarités utilisées sont supérieures à 5 µM, avec une diminution d'un facteur 100 par rapport au contrôle à 25 µM et de presque quatre ordres de magnitude à 50 µM, montrant que lié au virus, il bloque la fixation au récepteur cellulaire. Comme précédemment, le peptide MH20 à des concentrations de 50 µM ne présente aucun effet cytotoxique et n'influence pas l'expression du gène reporter après le préattachement ou la préendocytose de l'Ad5Luc3. L'inhibition presque totale de l'activité luciférase en présence de 50 µM

de MH20 est le reflet d'une neutralisation complète du virus.

EXEMPLE 6 : Séro-spécificité de la neutralisation virale par les peptides synthétiques.

5

Les adénovirus sauvages Ad5, Ad2 Ad3 sont préincubés pendant 2 h à température ambiante avec le peptide inhibiteur MH20 à une molarité constante (25 μ M), la MOI variant de 0,2 à 2 pfu/cellule. Le mélange est mis en présence des cellules HeLa pendant 1 h à 0°C et la culture poursuivie à 37°C après élimination des virus non adsorbés dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus. Le niveau de synthèse de l'hexon, de la protéine 100k, du penton base et de la fibre est estimé par immunotitration (Wohlfart, 1988, J. Virol. 62, 2321-2328) sur les extraits cellulaires recueillis 48 h après l'infection.

L'infection des cellules HeLa par l'Ad5 ou l'Ad2 à une MOI de 0,2 à 2 pfu/cellule en présence de 25 μ M de MH20 pendant la phase d'attachement du virus, est suivie d'une inhibition de la synthèse des protéines de la capsid virale hexon, protéine 100 k, penton base et fibre 48 h après l'infection (facteur 15 à 30). Par contre, lorsque l'infection est réalisée dans les mêmes conditions par l'Ad3 sauvage, la synthèse des protéines structurales n'est réduite que d'un facteur 1,5 à 2, ce qui suggère que la neutralisation adénovirale par MH20 est sérotype dépendante.

EXEMPLE 7 : Affinité de la fibre Ad5 pour les peptides FN20 et MH20.

5, 10 et 25 μ M de peptides synthétiques FN20 ou MH20 sont immobilisés sur la surface polystyrène d'une plaque de microtitration à 96 puits (Nunc, Maxisorb) pendant une nuit à 4°C. Après lavage puis blocage avec une solution d'albumine sérique bovine (BSA) 3 % dans du tampon PBS, on fait réagir des concentrations croissantes de fibres F5-FL581 reprises dans du tampon PBS et marquées radioactivement (marquage à la [³⁵S] méthionine et la [³⁵S] cystéine ; activité

spécifique de 50000 à 65000 cpm/ μ g de protéine). La fibre adsorbée sur l'un ou l'autre des peptides est éluée avec une solution adéquate (urée 1M, NaOH 1 M et SDS 1 %) puis précipitée en présence d'acide trichloroacétique. La radioactivité contenue dans le précipité récupéré sur filtre GF/C est comptée à l'aide d'un spectromètre à scintillation liquide (Beckman LS-6500) et les constantes de dissociation (K_d) déterminées selon Scatchard (1949, Annls NY Acad. Sci. 51, 660-672).

Le K_d de la fibre Ad5 marquée à l'égard du peptide MH20 est évalué à $3,0 \pm 0,6$ nM et celui trouvé pour le peptide FN20 est de $8,0 \pm 1,9$ nM ($n=3$ dans les deux cas).

EXEMPLE 8 : L'infectivité de l'Ad5 est dépendante de l'expression des MHC-I à la surface des cellules permissives.

La lignée Daudi de lymphoblastoïdes B, établie à partir d'un lymphome de Burkitt, est naturellement déficiente en l'expression de la β -2 microglobuline et, de ce fait, ne possède pas à sa surface les molécules HLA de classe I (Daudi HLA-). La lignée cellulaire E8.1 dérivée des Daudi a été générée par transfection d'un gène codant pour la β -2 microglobuline afin de restaurer l'expression de molécules HLA de classe I à leur surface (Daudi-HLA+ ; Quillet et al., 1988, J. Immunol. 141, 17-20).

Les expériences d'attachement de l'Ad5Luc3 à 0°C ont été menées sur les cellules Daudi HLA- et Daudi-HLA+ avec une MOI de trois ordres de magnitude plus forte que celle employée dans le cas des cellules HeLa (0,3 à 150 pfu/ 10^5 cellules). L'activité luciférase mesurée dans les lysats cellulaires 18 h post-infection est représentée à la Figure 4. Lorsque l'infection concerne les cellules Daudi-HLA+, l'activité luciférase augmente régulièrement d'une manière MOI dépendante jusqu'à atteindre un plateau au delà de 5 pfu/ 10^5 cellules. Pour ce qui est des cellules Daudi HLA-, le signal luminescent est très faible (3 à 4 ordres de magnitude) par rapport

- 29 -

à celui observé avec les cellules pourvues de molécules HLA fonctionnelles à leur surface. Ces expériences montrent que l'expression du MHC-I à la surface cellulaire est nécessaire à l'infection Ad5.

5 EXEMPLE 9 : Ligand bifonctionnel mimant les récepteurs primaires de l'adénovirus.

10 Ce exemple décrit la construction d'un peptide bifonctionnel qui contient deux domaines, l'un reconnaissant la tête de la fibre adénovirale et l'autre une protéine cellulaire de surface. On utilise ci-après un peptide dans lequel le MH20 est fusionné au GRP (Gastrin Releasing Peptide). Deux constructions sont possibles, orientant les deux domaines peptidiques de façon inversée, N- versus C-terminal, donnant lieu au peptide MH20-GRP (SEQ ID No: 22) et au peptide à orientation inverse GRP-MH20 (SEQ ID No: 23).

15 Comme illustré à la Figure 5, la liaison de ce peptide aux récepteurs GRP de la surface cellulaire devrait créer des «leurres» de récepteurs viraux du même type que les récepteurs primaires, c'est à dire le domaine $\alpha 2$ des molécules de classe I du MHC. Le résultat apparent est de créer ou d'augmenter le nombre de récepteurs viraux primaires de l'adénovirus à la surface de cellules possédant des récepteurs au

20 GRP.

25 Les cellules humaines (HeLa) ou murines (Swiss-3T3 ou NIH-3T3, ATCC CRL-1658) sont rincées et incubées entre 0 et 4°C avec une solution isotonique (PBS) à 500 μ M en peptide. Après 1 h, la solution est enlevée et remplacée par l'inoculum viral (Ad5Luc3) selon un protocole déjà décrit (voir ci-avant ou Hong et al., 1997, EMBO J. 16, 2294-2306). Le virus est incubé 1 heure entre 0 et 4°C pour permettre son attachement, puis l'excès de virus non adsorbé est rincé avec du milieu de culture pré-refroidi à 4°C et les cellules sont remplacées à 37°C en présence de milieu de culture pré-chauffé à 37°C. Le virus est endocytosé à 37°C et le cycle viral se déroule alors pendant 18 à 20 h à 37°C.

Comme montré à la Figure 6, on constate que les courbes obtenues en absence de tout peptide (courbes témoin indiquées : - peptide) et celles en présence de peptide dans l'orientation MH20 côté N-terminal - lié au GRP en C-terminal (MH20 - GRP) présentent une pente identique.

- 5 Par contre, dans le cas de l'orientation inverse, GRP du côté N-terminal, et MH20 du côté C-terminal, l'augmentation du nombre de virus adsorbés est significative, comme le montre l'augmentation de l'activité luciférase : 8 à 10 fois pour le NIH-3T3, 5 à 6 fois pour les cellules HeLa et 2 à 3 fois pour les Swiss-3T3. La liaison de la portion GRP du peptide bifonctionnel, ligand des récepteurs GRP,
- 10 a permis d'accroître le nombre apparent de récepteurs de la fibre d'Ad5, de type domaine alpha 2 des molécules de classe I du MHC (MHC I- α 2).

- 31 -

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: Centre National de la Recherche Scientifique
(CNRS)
- (B) RUE: 3 rue Michel Ange
- (C) VILLE: Paris
- (E) PAYS: France
- (F) CODE POSTAL: 75794 Cedex 16
- (G) TELEPHONE: (33) 01 44 96 40 00
- (H) TELECOPIE: (33) 01 44 96 50 00

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Récepteurs cellulaires des adénovirus.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 23

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 25 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(v) TYPE DU FRAGMENT: interne

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Homo sapiens
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: domaine alpha 2 des antigenes MHC-I
(positions 156 a 180)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

Leu	Arg	Ala	Tyr	Leu	Glu	Gly	Thr	Cys	Val	Glu	Trp	Leu	Arg	Arg	Tyr
1				5					10					15	
Leu	Glu	Asn	Gly	Lys	Glu	Thr	Leu	Gln							
			20					25							

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

- 32 -

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 26 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (v) TYPE DU FRAGMENT: interne
- (vi) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: homo sapiens
 (C) INDIVIDUEL ISOLE: module de type III 1 de la fibronectine humaine
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn | Ser | His | Pro | Ile | Gln | Trp | Asn | Ala | Pro | Gln | Pro | Ser | His | Ile | Ser |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | | | 15 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Lys | Tyr | Ile | Leu | Arg | Trp | Arg | Pro | Lys | Asn | | | | | | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | | | |
- (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 25 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (v) TYPE DU FRAGMENT: interne
- (vi) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: homo sapiens
 (C) INDIVIDUEL ISOLE: module de type III 4 de la fibronectine humaine
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Lys | Val | Thr | Ile | Met | Trp | Thr | Pro | Pro | Glu | Ser | Ala | Val | Thr | Gly |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | | | 15 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tyr | Arg | Val | Asp | Val | Ile | Pro | Val | Asn | | | | | | | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | | | |
- (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 25 acides aminés

- 33 -

- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(v) TYPE DU FRAGMENT: interne

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: homo sapiens
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: module de type III 5 de la fibronectine humaine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

Ser Thr Val Leu Val Arg Trp Thr Pro Pro Arg Ala Gln Ile Thr Gly
1 5 10 15

Tyr Arg Leu Thr Val Gly Leu Thr Arg
20 25

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 25 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(v) TYPE DU FRAGMENT: interne

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: homo sapiens
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: module de type III 14 de la fibronectine humaine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly
1 5 10 15

Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Ser
20 25

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

- 34 -

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: peptide de synthese MH20

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

Arg Ala Ile Val Gly Phe Arg Val Gln Trp Leu Arg Arg Tyr Phe Val
1 5 10 15

Asn Gly Ser Arg
20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 20 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: peptide de synthese FN20

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

Arg His Ile Leu Trp Thr Pro Ala Asn Thr Pro Ala Met Gly Tyr Leu
1 5 10 15

Ala Arg Val Ser
20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 18 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(v) TYPE DU FRAGMENT: interne

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Mastadenovirus

(C) INDIVIDUEL ISOLE: serotype 5

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

Leu Ala Pro Ile Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg
1 5 10 15

- 35 -

Phe Asp

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 16 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(v) TYPE DU FRAGMENT: interne

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: serotype 2

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

Thr	Val	Ala	Ser	Val	Ser	Ile	Phe	Leu	Arg	Phe	Asp	Gln	Asn	Gly	Val
1				5					10					15	

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 14 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(v) TYPE DU FRAGMENT: interne

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: serotype 5

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

Leu	Asp	Pro	Glu	Tyr	Trp	Asn	Phe	Arg	Asn	Gly	Asp	Leu	Thr
1				5					10				

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 13 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

- 36 -

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(v) TYPE DU FRAGMENT: interne

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Mastadenovirus

(B) SOUCHE: serotype 2

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

Asn	Ser	Ser	Leu	Lys	Lys	His	Tyr	Trp	Asn	Phe	Arg	Asn
1				5					10			

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 42 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Mastadenovirus

(B) SOUCHE: serotype 5

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese (nt32164
32205 Ad5)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

CCTAAACTAG GATCCGGCCT TAGTTTTGAC AGCATGGGTG CC

42

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 37 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Mastadenovirus

- 37 -

- (B) SOUCHE: serotype 5
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese (nt-32919 32883 Ad5)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

CTGTGAGTTT GATTAAGGTA CCGTGATCTG TATAAGC

37

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 36 paires de bases.
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: serotype 3
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese (Ad3)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

GGTCTTACAT TTGACTCTTC CATGGCTATT GCACTG

36

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 35 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: serotype 3
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese (Ad3)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

CAATAAAAAA TGTGGTACCT TATTTTGTGTT GTCAG

35

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 16:

- 38 -

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 51 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: homo sapiens
(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese
(sequence consensus FNIII)
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:
TCGAGAGGCA TATACTTTGG ACTCCTGCTA ATACACCGGC AATGGGGTAT G 51
- (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 17:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 51 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI
- (vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: homo sapiens
(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese
(sequence consensus FNIII)
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:
TCGACATACC CCATTGCCGG TGTATTAGCA GGAGTCCAAA GTATATGCCT C 51
- (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 18:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 65 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON

- 39 -

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: homo sapiens
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese codant pour la séquence consensus MHC-I

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

TCGAGAGGGC TATAGTTGGG TTAGGGTGC AATGGCTTAG GCGGTATTTT GTGAATGGGT 60
CGAGG 65

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 65 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: homo sapiens
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese codant pour aa 157-176 du MHC-I

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

TCGACCTCGA CCCATTCACA AAATACCGCC TAAGCCATTG CACCCTAAAC CCAACTATAG 60
CCCTC 65

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: serotype 5
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese (nt 31021-31050 Ad5)

- 40 -

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

CCATCCGCAC CCACTATGAT CACGTTGTTG

30

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 21:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 27 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: serotype 3
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese (Ad3)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:

CTTCATTTCT TTATCCCCC ATGGCCA

27

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 22:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 35 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(v) TYPE DU FRAGMENT: N-terminal

(vi) ORIGINE:

- (C) INDIVIDUEL ISOLE: MH20/GRP

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 22:

Arg	Ala	Ile	Val	Gly	Phe	Arg	Val	Gln	Trp	Leu	Arg	Arg	Tyr	Phe	Val
1				5					10					15	

Asn	Gly	Ser	Arg	Lys	Met	Tyr	Pro	Arg	Gly	Asn	His	Trp	Ala	Val	Gly
			20					25					30		

His	Leu	Met
		35

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 23:

- 41 -

- ```

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 35 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

 (v) TYPE DU FRAGMENT: N-terminal

(vi) ORIGINE:
 (C) INDIVIDUEL ISOLE: GRP/MH20

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 23:

Lys Met Tyr Pro Arg Gly Asn His Trp Ala Val Gly His Leu Met Arg
1 5 10 15

Ala Ile Val Gly Phe Arg Val Gln Trp Leu Arg Arg Tyr Phe Val Asn
 20 25 30

Gly Ser Arg
 35

```

Revendications

1. Utilisation d'un polypeptide comprenant une séquence en acides aminés  
5 homologue ou identique à au moins 6 acides aminés continus de la  
séquence telle que montrée :  
(a) dans la SEQ ID NO: 1 commençant avec le résidu leucine en position  
1 et finissant avec le résidu glutamine en position 25,  
(b) dans la SEQ ID NO: 2 commençant avec le résidu asparagine en  
10 position 1 et finissant avec le résidu asparagine en position 26,  
(c) dans la SEQ ID NO: 3 commençant avec le résidu valine en position  
1 et finissant avec le résidu asparagine en position 25,  
(d) dans la SEQ ID NO: 4 commençant avec le résidu sérine en position  
1 et finissant avec le résidu arginine en position 25, et/ou  
15 (e) dans la SEQ ID NO: 5 commençant avec le résidu asparagine en  
position 1 et finissant avec le résidu sérine en position 25 ;  
pour permettre ou faciliter l'attachement d'un adénovirus à une cellule  
hôte et/ou l'entrée dudit adénovirus au sein de ladite cellule hôte.
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le polypeptide  
20 comprend une séquence en acides aminés homologue ou identique à au  
moins 6 acides aminés continus de la séquence telle que montrée dans la  
SEQ ID NO: 1 commençant avec le résidu leucine en position 1 et  
finissant avec le résidu glutamine en position 25.
3. Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que le polypeptide  
25 comprend une séquence en acides aminés homologue ou identique à tout  
ou partie d'un antigène du complexe majeur d'histocompatibilité de classe  
I (MHC-I) et, de préférence, de la chaîne lourde dudit MHC-I.
4. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que le polypeptide  
30 comprend une séquence en acides aminés homologue ou identique à tout  
ou partie du domaine  $\alpha 2$  de ladite chaîne lourde.

5. Utilisation selon la revendication 3 ou 4, caractérisée en ce que le polypeptide comprend une séquence en acides aminés homologue ou identique à tout ou partie d'un antigène HLA A, B, C, D, E ou F.
6. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le polypeptide  
5 comprend une séquence en acides aminés homologue ou identique à au moins 6 acides aminés continus de la séquence telle que montrée :
  - dans la SEQ ID NO: 2 commençant avec le résidu asparagine en position 1 et finissant avec le résidu asparagine en position 26,
  - dans la SEQ ID NO: 3 commençant avec le résidu valine en position 1 et  
10 finissant avec le résidu asparagine en position 25,
  - dans la SEQ ID NO: 4 commençant avec le résidu sérine en position 1 et finissant avec le résidu arginine en position 25, et/ou
  - dans la SEQ ID NO: 5 commençant avec le résidu asparagine en position 1 et finissant avec le résidu sérine en position 25.
- 15 7. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que ledit polypeptide comprend une séquence en acides aminés homologue ou identique à tout ou partie de la fibronectine.
8. Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que ledit polypeptide comprend une séquence en acides aminés homologue ou identique à tout ou  
20 partie d'au moins un module de type III de la fibronectine.
9. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que ledit adénovirus est de sérotype C.
10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que ledit adénovirus est de sérotype 2 ou 5.
- 25 11. Cellule capable d'exprimer un polypeptide tel que défini selon l'une des revendications 1 à 10.
12. Cellule selon la revendication 11, caractérisée en ce que ladite cellule surexprime ledit polypeptide.
13. Utilisation d'une cellule selon la revendication 11 ou 12, pour permettre ou

faciliter l'attachement d'un adénovirus à ladite cellule et/ou l'entrée dudit adénovirus au sein de ladite cellule.

14. Utilisation d'un ligand pour influencer l'attachement d'un adénovirus à une cellule hôte et/ou l'entrée dudit adénovirus au sein de ladite cellule hôte médiés par un polypeptide tel que défini dans l'une des revendications 1 à 10.
15. Utilisation d'un ligand selon la revendication 14, pour influencer de façon négative l'attachement d'un adénovirus à ladite cellule hôte et/ou l'entrée dudit adénovirus au sein de ladite cellule hôte médiés par un polypeptide tel que défini selon l'une des revendications 1 à 5 et 9 et 10.
16. Utilisation d'un ligand selon la revendication 15, caractérisée en ce que ledit ligand comprend une séquence en acides aminés homologue ou identique à au moins 6 acides aminés continus compris dans la séquence telle que montrée dans la SEQ ID NO: 6 commençant avec le résidu arginine en position 1 et finissant avec le résidu arginine en position 20.
17. Utilisation d'un ligand selon la revendication 14, pour influencer de façon positive l'attachement d'un adénovirus à ladite cellule hôte et/ou l'entrée dudit adénovirus au sein de ladite cellule hôte médiés par un polypeptide tel que défini selon l'une des revendications 1 et 6 à 10.
18. Utilisation d'un ligand selon la revendication 17, caractérisée en ce que ledit ligand comprend une séquence en acides aminés homologue ou identique à au moins 6 acides aminés continus compris dans la séquence telle que montrée dans la SEQ ID NO: 7 commençant avec le résidu arginine en position 1 et finissant avec le résidu serine en position 20.
19. Utilisation d'un ligand selon l'une des revendications 14 à 18, caractérisée en ce que ledit ligand a une constante de dissociation (kd) à l'égard dudit adénovirus de 0,01 à 100 nM, et notamment de 0,1 à 50 nM.
20. Ligand tel que défini dans la revendication 16, 18 ou 19.
21. Utilisation d'un ligand selon la revendication 14, caractérisée en ce que ledit ligand est d'origine adénovirale.

22. Utilisation selon la revendication 21, caractérisée en ce que ledit ligand dérive de la fibre d'un adénovirus et, notamment, du domaine de la tête.
23. Utilisation selon la revendication 22 pour interagir avec un polypeptide tel que défini selon l'une des revendications 1 à 5 et 9 et 10, caractérisée en ce que ledit ligand dérive de la fibre d'un adénovirus de sérotype 5 et comprend une séquence en acides aminés homologue ou identique à au moins 6 acides aminés continus de la séquence telle que montrée dans la SEQ ID NO: 8 commençant avec le résidu leucine en position 1 et finissant avec le résidu acide aspartique en position 18.
24. Utilisation selon la revendication 22 pour interagir avec un polypeptide tel que défini selon l'une des revendications 1 à 5 et 9 et 10, caractérisée en ce que ledit ligand dérive de la fibre d'un adénovirus de sérotype 2 et comprend une séquence en acides aminés homologue ou identique à au moins 6 acides aminés continus de la séquence telle que montrée dans la SEQ ID NO: 9, commençant avec le résidu thréonine en position 1 et finissant avec le résidu valine en position 16.
25. Utilisation selon la revendication 22 pour interagir avec un polypeptide tel que défini selon l'une des revendications 1 et 6 à 10, caractérisée en ce que ledit ligand dérive de la fibre d'un adénovirus de sérotype 5 et comprend une séquence en acides aminés homologue ou identique à au moins 6 acides aminés continus de la séquence telle que montrée dans la SEQ ID NO: 10 commençant avec le résidu leucine en position 1 et finissant avec le résidu thréonine en position 14.
26. Utilisation selon la revendication 22 pour interagir avec un polypeptide tel que défini selon l'une des revendications 1 et 6 à 10, caractérisée en ce que ledit ligand dérive de la fibre d'un adénovirus de sérotype 2 et comprend une séquence en acides aminés homologue ou identique à au moins 6 acides aminés continus de la séquence telle que montrée dans la SEQ ID NO: 11 commençant par le résidu asparagine en position 1 et se terminant au résidu asparagine en

position 13.

27. Utilisation d'un ligand selon l'une des revendications 14 à 26, pour la préparation d'un médicament destiné à inhiber ou diminuer une infection par un adénovirus.
28. Utilisation d'un ligand selon l'une des revendications 14 à 26, pour la préparation d'un médicament destiné à favoriser ou faciliter une infection par un adénovirus et, en particulier, un adénovirus recombinant.
29. Méthode pour sélectionner ou identifier un récepteur cellulaire d'un virus dans un échantillon approprié, comprenant les étapes suivantes :
- (a) immobilisation sur un support inerte d'un réactif d'origine virale comprenant tout ou partie d'une protéine de surface dudit virus déterminant l'attachement dudit virus audit récepteur cellulaire,
- (b) incubation pendant un temps déterminé avec ledit échantillon,
- (c) élution de l'échantillon retenu à l'étape (b) avec tout ou partie d'un anticorps dirigé contre ledit réactif d'origine virale, et
- (d) analyse de l'échantillon élué à l'étape (c).
30. Méthode pour sélectionner ou identifier la partie d'une protéine virale déterminant l'attachement d'un virus à un récepteur cellulaire dans un échantillon approprié, comprenant les étapes suivantes :
- (a) immobilisation sur un support inerte de tout ou partie d'un anticorps dirigé contre ladite protéine virale,
- (b) incubation pendant un temps déterminé avec ledit échantillon,
- (c) élution de l'échantillon retenu à l'étape (b) avec un réactif d'origine virale comprenant tout ou partie de ladite protéine virale, et
- (d) analyse de l'échantillon élué à l'étape (c).
31. Méthode selon la revendication 29 ou 30, caractérisée en ce que ledit échantillon est une bibliothèque peptidique ou une bibliothèque de phages exprimant des motifs peptidiques.
32. Méthode selon l'une des revendications 29 à 31, caractérisée en ce que ledit virus est un adénovirus, notamment de sérotype C, le réactif d'origine virale



comprend à tout ou partie de la fibre et, notamment, de la tête d'un adénovirus et l'anticorps est inhibiteur de l'attachement du virus à la surface de la cellule hôte.

- 5 33. Utilisation d'un ligand bifonctionnel pour le ciblage d'un adénovirus vers une protéine de surface cellulaire autre que le récepteur cellulaire naturel dudit adénovirus, ledit ligand bifonctionnel comportant une première partie ligand capable d'interagir avec la fibre dudit adénovirus, une deuxième partie ligand capable d'interagir avec ladite protéine de surface cellulaire et, éventuellement, un espaceur entre lesdites première et deuxième parties ligands ; ladite première
- 10 partie ligand ayant les caractéristiques du ligand tel que défini aux revendications 14 à 20.
34. Utilisation selon la revendication 33, selon laquelle ladite première partie ligand comprend une séquence en acides aminés homologue ou identique à au moins 6 acides aminés continus compris dans la SEQ ID NO: 6 et plus
- 15 particulièrement a une séquence en acides aminés identique à la SEQ ID NO: 6 commençant avec le résidu arginine en position 1 et finissant avec le résidu arginine en position 20.
35. Utilisation selon la revendication 33 ou 34, selon laquelle ledit ligand bifonctionnel comprend une séquence en acides aminés homologue ou identique
- 20 à tout ou partie de la séquence telle que montrée :
- (i) dans la SEQ ID NO: 22 débutant au résidu arginine en position 1 et finissant avec le résidu méthionine en position 35, ou
- (ii) dans la SEQ ID NO: 23 débutant au résidu lysine en position 1 et finissant avec le résidu arginine en position 35.
- 25 36. Ligand bifonctionnel tel que défini dans l'une des revendications 33 à 35.
37. Cellule portant à sa surface un ligand bifonctionnel selon la revendication 36.

1/6

fibre : 438V L A V K G S L A P I S G T V Q S A H L I R F D E N G 465  
 (D)  
 1D6.3 V F - V K -- L - P  
 P - D V A P - S  
 L I P F N S  
 L S - N - Q S G  
 S G V G Q A  
 S V G D - Y G  
 G - I - S - H T G  
 G - I - S - H T G  
 G - A - S - H T V  
 H F Q Y R M  
 R R I F R - D

fibre : 470N S F L D P E Y W N F R H G D L T 486  
 (E) (F)  
 7A2.7 N Q P V Y F  
 L G P - V - N S  
 A L - P - - H I V  
 A - P - - H E L R  
 N N V G A H  
 V T S T Y H  
 L Q K V H -- R  
 D L W S V L  
 F W L A V R  
 W A L F R S  
 Y L G F F K  
 I A R -- L I S  
 R N Y T L T  
 R D A V M I  
 S R P T M L

FIGURE 1

2/6

FIGURE 2

(a) mAb 7A2.7

```

R H R M L Q
 R R H - - W - P F
 W - Y E - W - I G
 W - V - I W S I
 I - L W T - P G
 L Q - Y S L P
 L - L D - F - - P A
 L T - P - N T I
 L G - K A - L P
 S P H G S G
 A P M - V A L
 T A A M - Y R
 L F I A - R L
 Y L Y G R V
 A R V S R S

```

(b) Séquence consensus générée par compétition avec 7A2.7

R H - I - L W T - P A N T P A N G Y L A - R V S

Modules III de la fibronectine

```

FNIII1: N S H P I Q - W N A P Q P S H I S K Y I L - R W R P K I
FNIII4: V K V T I - M W T P P E S A - V T G Y R V - D V I P V M
FNIII5: S T V L V R - W T P P R A Q - I T G Y R L - T V G L T R
FNIII14: N S L L V S - W Q P P R A R - I T G Y I I - K Y E K P S

```

(c) mAb 1D6.3

```

A R A - I V G
 F V - W G L S
 F R V Q W - L
 Q V - H - L F R
 V Q W - F K P
 W - I - - F L M - Q
 R R Y F V - N
 Y F G S N S
 A Y G V M P
 L A P L G - K
 S R - L K M - G
 H M E L L M
 H S - - N G S R
 T R - V R - T S
 R - S E E T I

```

(d) Séquence consensus générée par compétition avec 1D6.3

A R A - I V G F R V Q W - L R R Y F V - N G S R E T I

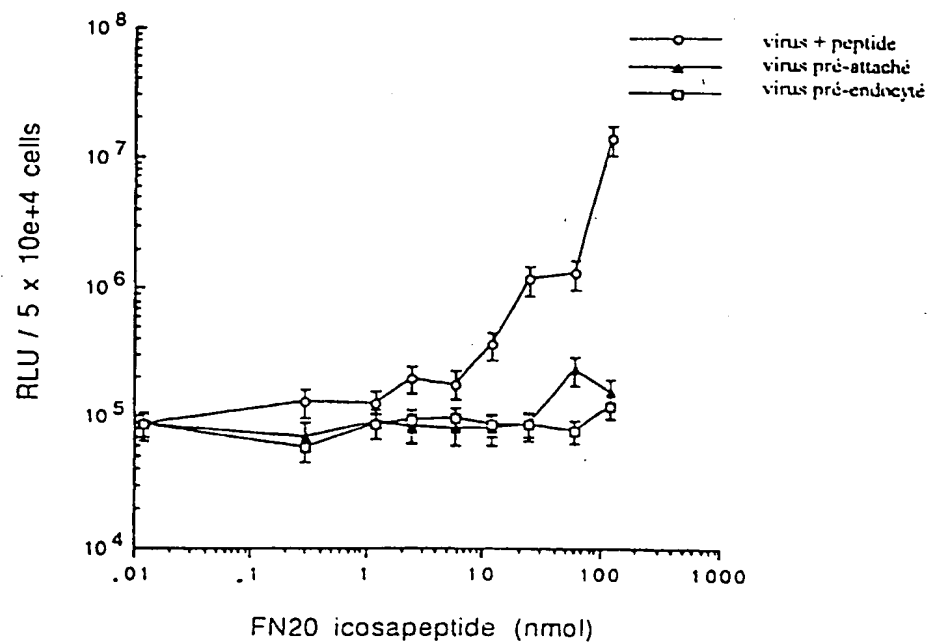
domaine α2 HLA (consensus):

<sup>156</sup>L R A Y L E G T C V E W - L R R Y L E - N G - K E T L Q<sup>180</sup>

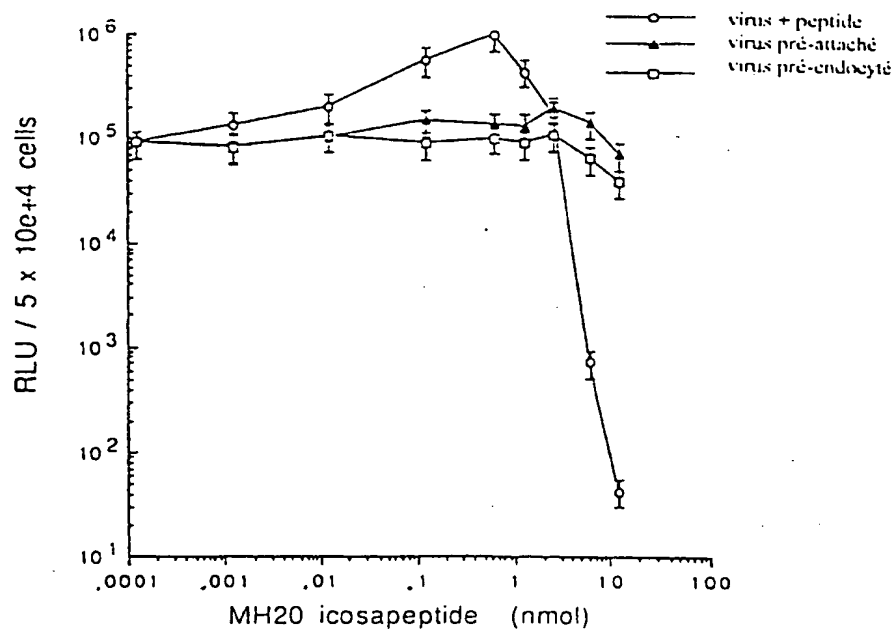
3/6

FIGURE 3

(a)



(b)



4/6

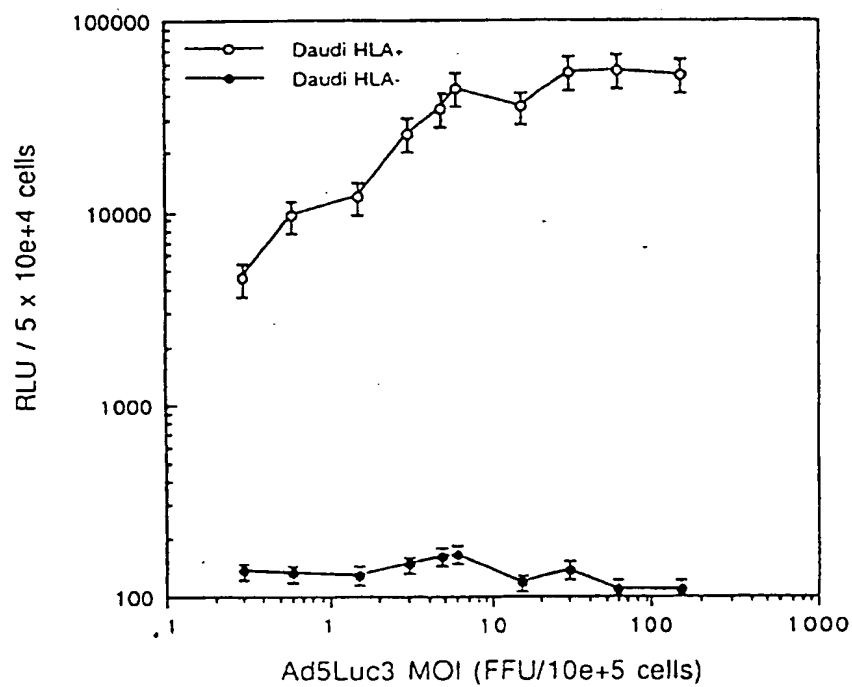


FIGURE 4

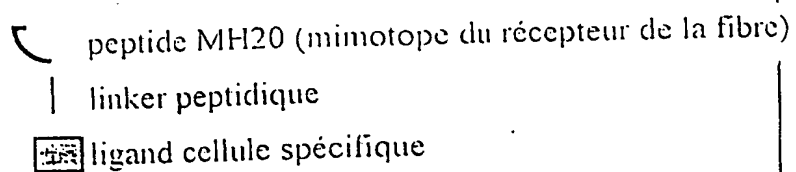
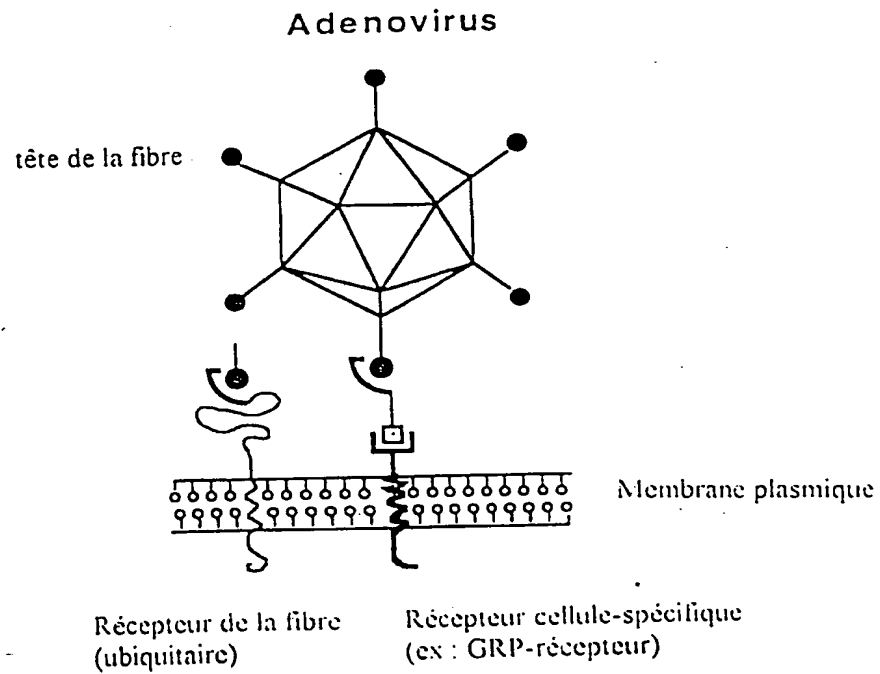


FIGURE 5

6/6

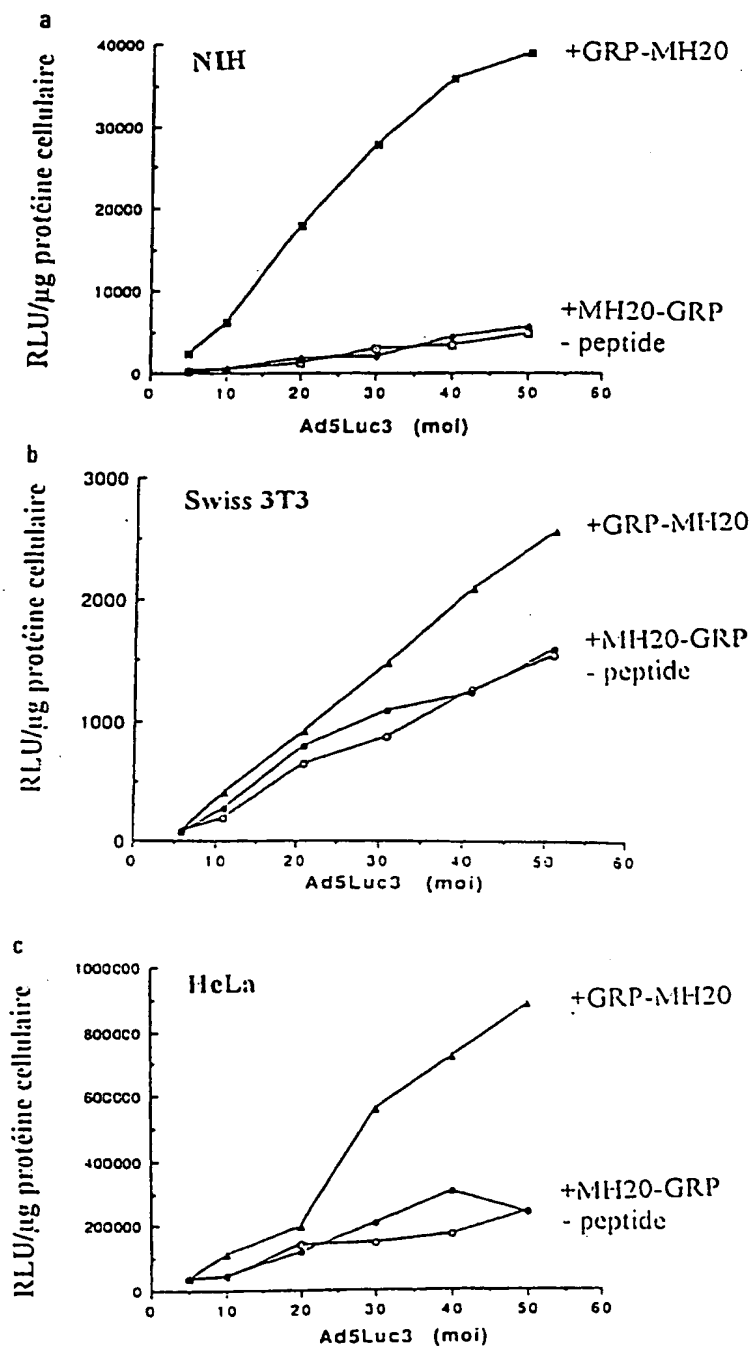
500 $\mu$ M

FIGURE 6



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :<br/>C12N 15/86, C07K 14/74, C12N 5/10,<br/>C07K 14/075, 14/78, A61K 48/00, C07K<br/>14/705, C12N 15/62</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | A3 | <p>(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 98/33929</b></p> <p>(43) Date de publication internationale: 6 août 1998 (06.08.98)</p>                                                                                                                                                                |
| <p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/00184</p> <p>(22) Date de dépôt international: 30 janvier 1998 (30.01.98)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité:<br/>97/01005 30 janvier 1997 (30.01.97) FR<br/>97/11166 9 septembre 1997 (09.09.97) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BOULANGER, Pierre [FR/FR]; 6, rue Maguelone, F-34000 Montpellier (FR). HONG, Saw, See [MY/FR]; 6, rue Maguelone, F-34000 Montpellier (FR). KARAYAN, Lucie [FR/FR]; 11, rue des Arènes Romaines, F-86000 Poitiers (FR).</p> <p>(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).</p> |    | <p>(81) Etats désignés: AU, CA, JP, SG, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée<br/>Avec rapport de recherche internationale.</p> <p>(88) Date de publication du rapport de recherche internationale:<br/>19 novembre 1998 (19.11.98)</p> |

(54) Title: USE OF A POLYPEPTIDE AS CELL RECEPTOR FOR ADENOVIRUSES

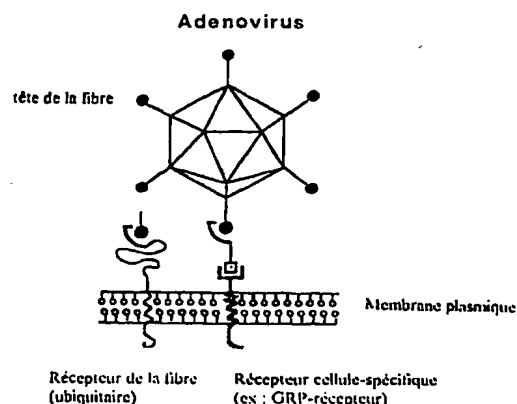
(54) Titre: UTILISATION D'UN POLYPEPTIDE A TITRE DE RECEPTEUR CELLULAIRE DES ADENOVIRUS

## (57) Abstract

The invention concerns the use of a polypeptide comprising at least 6 continuous amino acids of the sequence as shown in the sequence identifiers 1 to 5 as cell receptor and/or co-receptor of adenoviruses. It also concerns the use of a cell capable of expressing such a polypeptide and that of a ligand capable of influencing the binding of an adenovirus to a host cell and/or its insertion in said cell. Finally, the invention further concerns a method for selecting or identifying a cell receptor of a virus or part of a viral protein determining the binding of the virus to its cell receptor and the use of a bi-functional ligand for targeting an adenovirus towards a host cell bearing on its surface a surface protein other than the natural cell receptor of said adenovirus.

## (57) Abrégé

La présente invention a pour objet l'utilisation d'un polypeptide comprenant au moins 6 acides aminés continus de la séquence telle que montrée dans les identificateurs de séquence 1 à 5 à titre de récepteur et/ou co-récepteur cellulaire des adénovirus. Elle concerne également l'utilisation d'une cellule capable d'exprimer un tel polypeptide ainsi que celle d'un ligand capable d'influencer l'attachement d'un adénovirus à une cellule hôte et/ou son entrée au sein de ladite cellule hôte. Enfin, elle a également trait à une méthode pour sélectionner ou identifier un récepteur cellulaire d'un virus ou la partie d'une protéine virale déterminant l'attachement du virus à son récepteur cellulaire ainsi qu'à l'utilisation d'un ligand bifonctionnel pour cibler un adénovirus vers une cellule hôte portant à sa surface une protéine de surface autre que le récepteur cellulaire naturel dudit adénovirus.



peptide MH20 (mimotope du récepteur de la fibre)

linker peptidique

ligand cellule spécifique



# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

|    |                           |    |                                               |    |                                          |    |                       |
|----|---------------------------|----|-----------------------------------------------|----|------------------------------------------|----|-----------------------|
| AL | Albanie                   | ES | Espagne                                       | LS | Lesotho                                  | SI | Slovénie              |
| AM | Arménie                   | FI | Finlande                                      | LT | Lituanie                                 | SK | Slovaquie             |
| AT | Autriche                  | FR | France                                        | LU | Luxembourg                               | SN | Sénégal               |
| AU | Australie                 | GA | Gabon                                         | LV | Lettonie                                 | SZ | Swaziland             |
| AZ | Azerbaïdjan               | GB | Royaume-Uni                                   | MC | Monaco                                   | TD | Tchad                 |
| BA | Bosnie-Herzégovine        | GE | Géorgie                                       | MD | République de Moldova                    | TG | Togo                  |
| BB | Barbade                   | GH | Ghana                                         | MG | Madagascar                               | TJ | Tadjikistan           |
| BE | Belgique                  | GN | Guinée                                        | MK | Ex-République yougoslave<br>de Macédoine | TM | Turkménistan          |
| BF | Burkina Faso              | GR | Grèce                                         | ML | Mali                                     | TR | Turquie               |
| BG | Bulgarie                  | HU | Hongrie                                       | MN | Mongolie                                 | TT | Trinité-et-Tobago     |
| BJ | Bénin                     | IE | Irlande                                       | MR | Mauritanie                               | UA | Ukraine               |
| BR | Brésil                    | IL | Israël                                        | MW | Malawi                                   | UG | Ouganda               |
| BY | Bélarus                   | IS | Islande                                       | MX | Mexique                                  | US | Etats-Unis d'Amérique |
| CA | Canada                    | IT | Italie                                        | NE | Niger                                    | UZ | Ouzbékistan           |
| CF | République centrafricaine | JP | Japon                                         | NL | Pays-Bas                                 | VN | Viet Nam              |
| CG | Congo                     | KE | Kenya                                         | NO | Norvège                                  | YU | Yougoslavie           |
| CH | Suisse                    | KG | Kirghizistan                                  | NZ | Nouvelle-Zélande                         | ZW | Zimbabwe              |
| CI | Côte d'Ivoire             | KP | République populaire<br>démocratique de Corée | PL | Pologne                                  |    |                       |
| CM | Cameroun                  | KR | République de Corée                           | PT | Portugal                                 |    |                       |
| CN | Chine                     | KZ | Kazakhstan                                    | RO | Roumanie                                 |    |                       |
| CU | Cuba                      | LC | Sainte-Lucie                                  | RU | Fédération de Russie                     |    |                       |
| CZ | République tchèque        | LI | Liechtenstein                                 | SD | Soudan                                   |    |                       |
| DE | Allemagne                 | LK | Sri Lanka                                     | SE | Suède                                    |    |                       |
| DK | Danemark                  | LR | Libéria                                       | SG | Singapour                                |    |                       |
| EE | Estonie                   |    |                                               |    |                                          |    |                       |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 98/00184

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 IPC 6 C12N15/86 C07K14/74 C12N5/10 C07K14/075 C07K14/78  
 A61K48/00 C07K14/705 C12N15/62

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                              | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | HENRY, L.J. ET AL.: "Characterization of the knob domain of the adenovirus type 5 fiber protein expressed in Escherichia coli"<br>JOURNAL OF VIROLOGY.,<br>vol. 68, no. 8, August 1994, ICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY US,<br>pages 5239-5246, XP002051921<br>cited in the application<br>see the whole document |                       |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 May 1998 (25.05.98)

Date of mailing of the international search report

10 August 1998 (10.08.98)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 98/00184

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                    | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | HONG, S.S. & BOULANGER, P.: "Protein ligands of the human adenovirus type 2 outer capsid identified by biopanning of a phage-displayed peptide library on separate domains of wild-type and mutant penton capsomers"<br>EMBO JOURNAL.,<br>vol. 14, no. 19, 1995, EYNSHAM, OXFORD GB,<br>pages 4714-4727, XP002051922<br>see the whole document<br>--- | 1                     |
| A         | CHROBOCZEK, J. ET AL.: "Adenovirus fiber" CURRENT TOPICS IN MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY,<br>vol. 199, 1995,<br>pages 163-200. XP002051923<br>cited in the application<br>see page 195, paragraph 3 - paragraph 4<br>---                                                                                                                               | 1                     |
| A         | HONG, J.S. & ENGLER, J. A.: "Domains required for assembly of adenovirus type 2 fiber trimers"<br>JOURNAL OF VIROLOGY.,<br>vol. 70, no. 10, october 1996, ICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY US,<br>pages 7071-7078, XP002052153<br>see page 7078, column 1, paragraph 2<br>---                                                                            | 1                     |
| A         | US 5 385 888 A (GOODENOW ROBERT S ET AL)<br>31 January 1995<br>see the whole document<br>---                                                                                                                                                                                                                                                          | 1                     |
| A         | WO 95 05189 A (UNIV CALIFORNIA) 23 February 1995<br>see the whole document,<br>---                                                                                                                                                                                                                                                                    | 1                     |
| A         | WO 94 05303 A (UNIV OKLAHOMA STATE) 17 March 1994<br>see the whole document<br>---                                                                                                                                                                                                                                                                    | 1                     |
| P,X       | HONG, S.S. ET AL.: "Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I alpha 2 domain at the surface of the human epithelial and B lymphoblastoid cells"<br>EMBO JOURNAL.,<br>vol. 16, no. 9, 1 May 1997, EYNSHAM, OXFORD GB,<br>pages 2294-2306, XP002051924<br>see the whole document<br>-----                                                       | 1                     |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 98/00184

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 1 to 5 and 13 relate to a method for treating the human/animal body, the search has been carried out and based on the effects imputed to the product/the composition

2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see annex

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

2-5 and in part 1, 11-13 (group 1)

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

The international searching authority has found a plurality of (groups of) inventions in the International Application, namely:

1. claims: 2 to 5 and, in part, 1, 11-13  
Utilisation of a polypeptide comprising an aminoacid sequence which is homologous or identical to at least 6 continuous aminoacids of sequence 1 in order to enable or facilitate the binding of said adenovirus to the host cell and/or the entry of said adenovirus into said host cell and cell capable of expressing such a polypeptide.
2. claims: 6-10 and, in part, 1, 11-13  
Utilisation of a polypeptide comprising an aminoacid sequence which is homologous or identical to at least 6 continuous aminoacids of a sequence such as that which is disclosed in the sequences 2, 3, 4 or 5 in order enable or facilitate the binding of said adenovirus to the host cell and/or the entry of said adenovirus into said host cell and cell capable of expressing such a polypeptide.
3. claims: 15, 16, 23 and, in part, 14, 19-20, 27-28, 36-37  
Utilisation of a soluble receptor polypeptide as ligand in order influence in a negative way the binding of an adenovirus to a host cell and/or the entry of said adenovirus into said host cell.
4. claims: 17, 18 and 23, and, in part, 14, 19-20, 27-28, 33-37  
Utilisation of a soluble receptor polypeptide as ligand in order to influence in a positive way the binding of an adenovirus to a host cell and/or the entry of said adenovirus into said host cell.
5. claims: 21-26 and, in part, 14, 19-20, 27-28, 33-37  
Utilisation of a ligand polypeptide of adenoviral origin in order to influence the binding of an adenovirus to a host cell and/or the entry of said adenovirus into said host cell.
6. claims: in part 14, 19-20, 27-28, 33-37  
Utilisation of a ligand to influence the binding of an adenovirus to a host cell and/or the entry of said adenovirus into said host cell in cases not related to subjects 3, 4 and 5.
7. claims: 29-32  
Biological biowashing method for selecting or identifying one of the entities of the binding couple viral protein/receptor of the permissive cell of a virus in an appropriate sample, comprising the following steps:  
(a) immobilization on an inert support either with the direct technique in order to identify the cell receptor of the viral reactant comprising all or part of a surface protein of said virus, or with the indirect technique in order to identify the portion of the viral protein which determines the binding of the virus to a cell receptor, with antibodies directed against said viral protein;

- (b) incubation during a predetermined time with said sample;
- (c) elution of the sample of step (b) with the complementary adequate reactant;
- (d) analysis of the eluted sample of step (c).

8. claims: in part 14, 19-20, 27-28, 33-37

Utilisation of a bifunctional ligand for the targeting of an adenovirus to a cell surface protein other than the natural receptor of said adenovirus, said bifunctional ligand comprising a first ligand portion capable of interacting with the fiber of said adenovirus, a second ligand portion capable of interacting with said cell surface protein and, optionally, a spacer between said first and second ligand portions, said first ligand portion having the characteristics of the ligand such as defined in claims 14 to 20.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International Application No  
**PCT/FR 98/00184**

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 5385888 A                              | 31-01-95            | US 5639458 A               | 17-06-97            |
| WO 9505189 A                              | 23-02-95            | US 5639458 A               | 17-06-97            |
|                                           |                     | AU 7526294 A               | 14-03-95            |
|                                           |                     | CA 2169285 A               | 23-02-95            |
|                                           |                     | EP 0725649 A               | 14-08-96            |
|                                           |                     | JP 9501921 T               | 25-02-97            |
| WO 9405303 A                              | 17-03-94            | US 5719064 A               | 17-02-98            |
|                                           |                     | AU 5124993 A               | 29-03-94            |
|                                           |                     | CA 2143322 A               | 17-03-94            |
|                                           |                     | EP 0667781 A               | 23-08-95            |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

C nde internationale No  
PCT/FR 98/00184

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |            |                               |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-------------------------------|
| A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |            |                               |
| CIB 6                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | C12N15/86                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | C07K14/74  | C12N5/10                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | C07K14/075 | C07K14/78                     |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | A61K48/00                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | C07K14/705 | C12N15/62                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |            |                               |
| Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |            |                               |
| B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |            |                               |
| Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |            |                               |
| CIB 6 C07K C12N                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |            |                               |
| Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |            |                               |
| Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |            |                               |
| C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |            |                               |
| Catégorie *                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents                                                                                                                                                                                                                                                                  |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |            | no. des revendications visées |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <p>HENRY, L.J. ET AL.: "Characterization of the knob domain of the adenovirus type 5 fiber protein expressed in Escherichia coli"</p> <p>JOURNAL OF VIROLOGY.,</p> <p>vol. 68, no. 8, août 1994, ICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY US,</p> <p>pages 5239-5246, XP002051921</p> <p>cité dans la demande</p> <p>voir le document en entier</p> <p>---</p> <p>-/--</p> |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |            | 1                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |            |                               |
| * Catégories spéciales de documents cités:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |            |                               |
| "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent<br>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date<br>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)<br>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens<br>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |            | "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention<br>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément<br>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier<br>"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets |            |                               |
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |            | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |            |                               |
| 25 mai 1998                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |            | 10. 08. 1998                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |            |                               |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |            | Fonctionnaire autorisé                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |            |                               |
| Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax: (+31-70) 340-3018                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |            | CHAMBONNET, F                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |            |                               |



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D nde internationale No  
PCT/FR 98/00184

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                               |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Catégorie                                       | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents                                                                                                                                                                                                                                                            | no. des revendications visées |
| A                                               | HONG, S.S. & BOULANGER, P.: "Protein ligands of the human adenovirus type 2 outer capsid identified by biopanning of a phage-displayed peptide library on separate domains of wild-type and mutant penton capsomers"<br>EMBO JOURNAL.,<br>vol. 14, no. 19, 1995, EYNSHAM, OXFORD GB,<br>pages 4714-4727, XP002051922<br>voir le document en entier<br>--- | 1                             |
| A                                               | CHROBOCZEK, J. ET AL.: "Adenovirus fiber" CURRENT TOPICS IN MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY,<br>vol. 199, 1995,<br>pages 163-200, XP002051923<br>cité dans la demande<br>voir page 195, alinéa 3 - alinéa 4<br>---                                                                                                                                            | 1                             |
| A                                               | HONG, J.S. & ENGLER, J. A.: "Domains required for assembly of adenovirus type 2 fiber trimers"<br>JOURNAL OF VIROLOGY.,<br>vol. 70, no. 10, octobre 1996, ICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY US,<br>pages 7071-7078, XP002052153<br>voir page 7078, colonne 1, alinéa 2<br>---                                                                                 | 1                             |
| A                                               | US 5 385 888 A (GOODENOW ROBERT S ET AL)<br>31 janvier 1995<br>voir le document en entier<br>---                                                                                                                                                                                                                                                          | 1                             |
| A                                               | WO 95 05189 A (UNIV CALIFORNIA) 23 février 1995<br>voir le document en entier<br>---                                                                                                                                                                                                                                                                      | 1                             |
| A                                               | WO 94 05303 A (UNIV OKLAHOMA STATE) 17 mars 1994<br>voir le document en entier<br>---                                                                                                                                                                                                                                                                     | 1                             |
| P,X                                             | HONG, S.S. ET AL.: "Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I alpha 2 domain at the surface of the human epithelial and B lymphoblastoid cells"<br>EMBO JOURNAL.,<br>vol. 16, no. 9, 1 mai 1997, EYNSHAM, OXFORD GB,<br>pages 2294-2306, XP002051924<br>voir le document en entier<br>-----                                                       | 1                             |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

- demande internationale n°

PCT/FR 98/00184

**Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)**

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n°  
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:  
Remarque: Bien que la(les) revendication(s) 1 à 5 et 13  
concernent une méthode de traitement du corps humain/animal,  
la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés  
au produit/à la composition.
2. ☐ Les revendications n°  
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour  
qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n°  
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la  
troisième phrases de la règle 6.4.a).

**Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)**

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

see annex

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°
4. ☒ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°  
2-5 et partiellement 1,11-13 (groupe 1)

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

**SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210**

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: 2 à 5 et partiellement 1, 11-13

Utilisation d'un polypeptide comprenant une séquence en acides aminés homologue ou identique à au moins 6 acides aminés continus de la séquence 1 pour permettre ou faciliter l'attachement dudit adénovirus à la cellule hôte et/ou l'entrée dudit adénovirus au sein de ladite cellule hôte et cellule capable d'exprimer un tel polypeptide.

2. revendications: 6 à 10 et partiellement 1, 11-13

Utilisation d'un polypeptide comprenant une séquence en acides aminés homologue ou identique à au moins 6 acides aminés continus d'une séquence telle que montrée dans les séquences 2, 3, 4, ou 5 pour permettre ou faciliter l'attachement dudit adénovirus à la cellule hôte et/ou l'entrée dudit adénovirus au sein de ladite cellule hôte et cellule capable d'exprimer un tel polypeptide.

3. revendications: 15, 16, 23 et partiellement 14, 19-20, 27-28, 33-37

Utilisation d'un polypeptide récepteur soluble comme ligand pour influencer de manière négative l'attachement d'un adénovirus à une cellule hôte et/ou l'entrée dudit adénovirus au sein de ladite cellule hôte.

4. revendications: 17,18 et 23 et partiellement 14, 19-20, 27-28, 33-37

Utilisation d'un polypeptide récepteur soluble comme ligand pour influencer de manière positive l'attachement d'un adénovirus à une cellule hôte et/ou l'entrée dudit adénovirus au sein de ladite cellule hôte

5. revendications: 21 à 26 et partiellement 14, 19-20, 27-28, 33-37

Utilisation d'un polypeptide ligand d'origine adénovirale pour influencer l'attachement d'un adénovirus à une cellule hôte et/ou l'entrée dudit adénovirus au sein de ladite cellule hôte

6. revendications: partiellement 14, 19-20, 27-28, 33-37

Utilisation d'un ligand pour influencer l'attachement d'un adénovirus à une cellule hôte et/ou l'entrée dudit

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

adénovirus au sein de ladite cellule hôte dans les cas ne relevant pas des sujets 3, 4, et 5.

7. revendications: 29-32

Méthode de biorpaillage pour sélectionner ou identifier l'une des entités du couple de liaison protéine virale/récepteur de la cellule permissive d'un virus dans un échantillon approprié, comprenant les étapes :

- (a) immobilisation sur un support inerte soit dans la technique directe pour identifier le récepteur cellulaire, du réactif d'origine virale comprenant tout ou partie d'une protéine de surface dudit virus, soit dans la technique indirecte pour identifier la partie de la protéine virale déterminant l'attachement du virus à un récepteur cellulaire, avec des anticorps dirigés contre ladite protéine virale,
- (b) incubation pendant un temps déterminé avec ledit échantillon
- (c) élution de l'échantillon retenu à l'étape (b) avec le réactif complémentaire adéquat
- (d) analyse de l'échantillon élué à l'étape (c)

8. revendications: partiellement 14, 19-20, 27-28, 33-37

Utilisation d'un ligand bifonctionnel pour le ciblage d'un adénovirus vers une protéine de surface cellulaire autre que le récepteur naturel dudit adénovirus, ledit ligand bifonctionnel comportant une première partie ligand capable d'interagir avec la fibre dudit adénovirus, une deuxième partie ligand capable d'interagir avec ladite protéine de surface cellulaire et, éventuellement, un espaceur entre lesdites première et deuxième parties ligands, ladite première partie ligand ayant les caractéristiques du ligand tel que défini aux revendications 14 à 20.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

D nde internationale No

PCT/FR 98/00184

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s) | Date de<br>publication |
|-------------------------------------------------|------------------------|-----------------------------------------|------------------------|
| US 5385888 A                                    | 31-01-95               | US 5639458 A                            | 17-06-97               |
| WO 9505189 A                                    | 23-02-95               | US 5639458 A                            | 17-06-97               |
|                                                 |                        | AU 7526294 A                            | 14-03-95               |
|                                                 |                        | CA 2169285 A                            | 23-02-95               |
|                                                 |                        | EP 0725649 A                            | 14-08-96               |
|                                                 |                        | JP 9501921 T                            | 25-02-97               |
| WO 9405303 A                                    | 17-03-94               | US 5719064 A                            | 17-02-98               |
|                                                 |                        | AU 5124993 A                            | 29-03-94               |
|                                                 |                        | CA 2143322 A                            | 17-03-94               |
|                                                 |                        | EP 0667781 A                            | 23-08-95               |